

Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der TU München,  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
und  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg,  
Institut für Inhalationsbiologie,  
Projektfeld: Umweltrelevanz von Aerosolen

**Oxidative und inflammatorische Mechanismen von Targetzellen des  
Alveolarepithels nach Exposition mit ultrafeinen Aerosolpartikeln  
an der Luft-Medium-Grenzschicht**

**Ellen Bitterle**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Niessner  
2. apl. Prof. Dr. J. Heyder,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 27.07.04 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.10.04 angenommen.



Für meine Eltern -

und für Stef -

Du bist mein Glück.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 2001 und Juli 2004 als Gemeinschaftsprojekt des Lehrstuhls für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der TU München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie und des Instituts für Inhalationsbiologie, Projektfeld: Umweltrelevanz von Aerosolen, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

Prof. Dr. Reinhard Niessner

und

Prof. Dr. Joachim Heyder

überließen mir dieses interessante Thema zur selbstständigen Bearbeitung und standen mir stets unterstützend und beratend zur Seite.

Dr. Konrad Maier

betreute und begleitete das Projekt fachkundig und tatkräftig, lieferte entscheidende Anregungen und korrigierte diese Dissertation.

Dr. Thomas Hofer

führte mich in molekular- und zellbiologische Methoden ein und leistete wichtige Vorarbeiten für die Luft-Medium-Grenzschicht-Exposition.

Dr. Armin Tippe

legte mit seiner Arbeit den Grundstein, der die Berechnung einer Partikeldosimetrie möglich machte.

Dr. Wolfgang Kreyling

lieferte zahlreiche Diskussionsbeiträge und unterstützte mich finanziell über das Projektfeld Gesundheitsrelevanz von Aerosolen.

Von Erwin Karg und Andreas Schröppel stammten die Geräte und das Know-how zur Generierung, Verdünnung und Charakterisierung des Aerosols, Dr. George Ferron ließ mich an seinem physikalischen Wissen teilhaben, Bernd Lentner wartete den Generator und Gunther Eder war bei der Bestimmung der Gaszusammensetzung behilflich.

Prof. Dr. Löms Ziegler-Heitbrock und Dr. Marion Frankenberger von der klinischen Kooperationsgruppe Entzündliche Lungenerkrankungen in Gauting unterstützten mich großzügig bei den Arbeiten am LightCycler und waren wichtige Diskussionspartner.

Dr. Anke Lenz, Dr. Ingrid Beck-Speier, Gabi Schumann, Helga Hinze-Heyn und Niru Dayal nahmen mich freundlich in die Biochemie-Gruppe auf und standen mir tatkräftig zur Seite.

Die Werkstatt der GSF, vor allem Herr Dietz und Herr Huber, bauten die Expositionsammern um.

Dr. Barbara Rothen-Rutishauser von der Universität Bern unterstützte mich bei den Occludin-Färbungen.

Im Labor von Dr. Robert Geffers bei der GBF in Braunschweig wurden die Affymetrix-GeneChip-Analysen durchgeführt.

Georg Brendel hat die Dissertation korrekturgelesen.

Valerie Albrecht, Claudia Wehner, Dr. Claudia Reinhard, Armin Messerer, Dr. Thomas Meindl und Dr. Fabian Mühlberger halfen mir mit Tipps und ihrer Freundschaft am Rande des Alltags-Trubels.

Die erwähnten Personen schafften den passenden Rahmen zur Erstellung dieser Arbeit.

**.... ihnen gilt mein herzlicher Dank.**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	EPIDEMIOLOGISCHE BEFUNDE MIT FEINEN UND ULTRAFEINEN AEROSOLEN - AKUTE UND CHRONISCHE EFFEKTE	1
1.2	ATMOSPHERISCHE AEROSOLE UND IHRE INTERAKTION MIT DEM ATEMTRAKT	2
1.2.1	<i>Gasförmige und partikuläre Verunreinigungen</i>	2
1.2.2	<i>Quellen der partikulären Noxen</i>	3
1.2.3	<i>Physikalisch-chemische Charakteristika partikulärer Verunreinigungen</i>	3
1.2.4	<i>Partikuläre Komponenten werden im Atemtrakt deponiert</i>	5
1.2.5	<i>Funktion des Atemtrakts</i>	6
1.3	INTERAKTION VON PARTIKELN MIT EPITHELZELLEN UND BIOLOGISCHE KONSEQUENZEN	7
1.3.1	<i>Welche Partikeleigenschaften können relevant sein?</i>	8
1.3.1.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	8
1.3.1.2	Chinone	9
1.3.1.3	Metalle	9
1.3.1.4	Matrix	9
1.3.1.5	Größe	10
1.4	EXPERIMENTELLE ANSÄTZE ZUR UNTERSUCHUNG PATHOPHYSIOLOGISCHER MECHANISMEN IN ALVEOLÄREN EPITHELZELLEN	11
1.4.1	<i>Exposition von submersen Kulturen mit suspendierten Partikeln</i>	11
1.4.2	<i>Exposition membranständiger Kulturen an der Luft-Medium-Grenzschicht</i>	12
1.4.3	<i>Partikelkonzentration und Dosimetrie</i>	14
1.4.4	<i>Eigenschaften von Umweltaerosolen und Modellpartikeln</i>	14
1.4.5	<i>Targetzellen</i>	16
1.5	FRAGESTELLUNG/ZIEL DER ARBEIT	17
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>19</b>
2.1	EIGENSCHAFTEN DES ULTRAFEINEN EC-AEROSOLS	19
2.1.1	<i>Verdünnung des Aerosols</i>	19
2.1.2	<i>Eigenschaften des Aerosols im Expositionssystem nach Befeuchtung</i>	20
2.1.3	<i>Eigenschaften des Aerosol nach Temperierung</i>	22
2.2	PARTIKELKONZENTRATIONEN IM GEFILTERTEN AEROSOL	24
2.3	AEROSOL DER LUFT-MEDIUM-GRENZSCHICHT-EXPOSITIONEN	25

---

2.4	AEROSOLVERUNREINIGUNGEN	30
2.5	TEMPERATUR	30
2.6	INTEGRITÄT DER MONOLAGEN AN A549-ZELLEN AUF ANODISK-MEMBRANEN	31
2.6.1	<i>Optische Integrität</i>	31
2.6.2	<i>Funktionelle Integrität</i>	32
2.6.3	<i>Adhäsive Interaktionen von Zellen</i>	32
2.7	VIABILITÄT VON A549-ZELLEN NACH KULTIVIERUNG UND EXPOSITION AN DER LUFT-MEDIUM-GRENZSCHICHT	33
2.7.1	<i>Trypanblau-Assay</i>	34
2.7.2	<i>WST1-Assay</i>	34
2.8	CLONTECH-ATLAS-ARRAY	36
2.8.1	<i>Exposition mit EC-Partikeln</i>	38
2.8.2	<i>Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF</i>	40
2.8.3	<i>PCR-Verifikation der Clontech-Array-Daten</i>	42
2.9	AFFYMETRIX-GENECHIPS	44
2.9.1	<i>Expositionen mit niedrigen Dosen EC-Partikel (LOW-DOSE)</i>	44
2.9.1.1	Exposition mit EC-Partikeln	45
2.9.1.2	Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF	46
2.9.1.3	Verifikation der Affymetrix-Daten (LOW-DOSE) mittels LC-PCR	47
2.9.2	<i>Expositionen mit hohen Dosen EC-Partikel (HIGH-DOSE)</i>	48
2.9.2.1	Exposition mit EC-Partikeln	49
2.9.2.2	Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF	49
2.9.2.3	Verifikation der Affymetrix-Daten (HIGH-DOSE) mittels LC-PCR	50
2.10	KULTIVIERUNGS- UND PARTIKEL-BEDINGTE STRESSREAKTIONEN: ANALYSE MITTELS LC-PCR	52
2.10.1	<i>Stressreaktionen nach Kultivierung von A549-Zellen an der Luft-Medium-Grenzschicht in Abwesenheit von Partikeln</i>	53
2.10.1.1	Zytokine: IL8 und IL6	53
2.10.1.2	HeatShock-Proteine: HeatShock-Protein 70B' und Hämoxxygenase 1	56
2.10.2	<i>Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln unter submersen Bedingungen</i>	59
2.10.2.1	Zytokine: IL8 und IL6	59
2.10.2.2	HeatShock-Proteine: HSPA6 und HO1	60

2.10.3	<i>Stressreaktionen nach EC-Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht</i>	62
2.10.3.1	Zytokine: IL8 und IL6	62
2.10.3.2	HeatShock-Proteine: HSPA6 und HO1	64
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>67</b>
3.1	LUFT-MEDIUM-GRENZSCHICHT-EXPOSITIONSSYSTEM	67
3.1.1	<i>Online-Partikeldosimetrie</i>	67
3.1.2	<i>Aerosolbefeuchtung</i>	68
3.2	EIGENSCHAFTEN UND KENNZAHLEN DES AEROSOLS	69
3.2.1	<i>Beeinflussung des Aerosols durch das Expositionssystem</i>	69
3.2.2	<i>Dosisbereiche für die Expositionen</i>	70
3.2.2.1	Submerse Expositionen	70
3.2.2.2	Expositionen an der Luft-Medium-Grenzschicht	71
3.2.3	<i>Oberflächeneigenschaften der uf-EC-Partikel</i>	73
3.3	ZELLMODELL	74
3.3.1	<i>Zielzellen im Alveolarbereich</i>	74
3.4	INTEGRITÄT DER MONOLAGE	75
3.5	VIABILITÄT	76
3.6	GENEXPRESSIONS-ARRAY	77
3.6.1	<i>Clontech-Atlas-Array</i>	78
3.6.1.1	Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array	78
3.6.1.2	Verifikation von Daten aus dem Clontech-Array mittels LC-PCR	80
3.6.2	<i>Affymetrix-GeneChips</i>	80
3.6.2.1	Stark und schwach regulierte Gene	81
3.6.2.2	Stressproteine	81
3.6.2.3	p53-beeinflussende Faktoren	82
3.6.2.4	Transkription	82
3.6.2.5	Lipidstoffwechsel	83
3.6.2.6	Rezeptoren	83
3.6.2.7	Proteine mit unbekannter Funktion	83
3.6.2.8	Verifikation von Daten aus den Affymetrix-GeneChips mittels LC-PCR	83



3.7	KULTIVIERUNGS- UND PARTIKEL-BEDINGTE STRESSREAKTIONEN	84
3.7.1	<i>Stressreaktionen nach Kultivierung von A549-Zellen an der Luft-Medium-Grenzschicht in Abwesenheit von Partikeln</i>	85
3.7.2	<i>Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln unter submersen Bedingungen</i>	86
3.7.3	<i>Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht</i>	87
3.7.4	<i>Vergleich der Stressreaktionen nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikel unter submersen Bedingungen und an der Luft-Medium-Grenzschicht</i>	88
3.7.5	<i>Biologische Konsequenzen und Bedeutung der zellulären Stressantwort auf ultrafeine Partikel</i>	89
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>96</b>
5.1	MATERIAL	96
5.1.1	<i>Reagenzien</i>	96
5.1.2	<i>Lösungen und Medien</i>	99
5.1.3	<i>Lösungen für Expressionsanalysen</i>	103
5.1.4	<i>Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße</i>	105
5.1.5	<i>Antikörper</i>	106
5.1.6	<i>Geräte und Materialien</i>	106
5.2	ETABLIERUNG DES SYSTEMS ZUR EXPOSITION VON ADHÄRENTEN ZELLEN MIT ULTRAFEINEN PARTIKELN AN DER LUFT-MEDIUM-GRENZSCHICHT	109
5.2.1	<i>Versuchsaufbau</i>	111
5.2.1.1	Palas-GFG1000-Generator	112
5.2.1.2	Verdünnungssystem	112
5.2.1.3	Befeuchterstrecke	113
5.2.1.4	Expositionskammer und ihre Integration in den Aufbau	113
5.2.1.5	Kontrollkammer	115

5.2.2	<i>Vorbereitung und Durchführung eines Expositionsexperiments</i>	116
5.2.2.1	Vorbereitung des Expositionssystems	116
5.2.2.2	Vorbereitung der Zellkulturen	116
5.2.2.3	Exposition mit uf-EC-Partikeln	117
5.2.3	<i>Einstellungen</i>	118
5.2.3.1	Monitoring	118
5.3	GRÖSSENVERTEILUNG UND KONZENTRATION DER LUFTGETRAGENEN EC-PARTIKEL IM EXPOSITIONSSYSTEM	119
5.4	TEMPERATUR DES AEROSOLS	121
5.5	KULTIVIERUNG UND EXPOSITION VON A549-ZELLEN	121
5.5.1	<i>Submerse Expositionen</i>	122
5.5.2	<i>Expositionen an der Luft-Medium-Grenzschicht</i>	123
5.6	FLUORESZENZMARKIERUNG DER ZYTOSKELETTKOMPONENTEN DER A549-ZELLEN	123
5.7	KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE	124
5.8	MESSUNG DES SPEZIFISCHEN TRANSEPITHELIALEN ELEKTRISCHEN WIDERSTANDS	124
5.9	MESSUNG DER VIABILITÄT VON A549-ZELLEN AN DER LUFT-MEDIUM-GRENZSCHICHT	125
5.10	GENEXPRESSIONS-ARRAYS	126
5.10.1	<i>Clontech-Atlas-Array</i>	126
5.10.1.1	Erste RNA-Isolierung	127
5.10.1.2	Reinheitsbestimmung	127
5.10.1.3	DNase-I-Verdau	128
5.10.1.4	Zweite RNA-Isolierung	128
5.10.1.5	Prüfung der RNA auf DNA-Kontamination durch PCR	128
5.10.1.6	Reverse Transkription in c-DNA mit radioaktiver Markierung	130
5.10.1.7	Hybridisierung auf den Clontech-Nylon-Membranen	131
5.10.1.8	Auswertung der Clontech-Daten	132
5.10.2	<i>Affymetrix-GeneChips</i>	132
5.10.2.1	Erste RNA-Isolierung	134
5.10.2.2	Reverse Transkription in c-DNA	134
5.10.2.3	c-DNA-Isolierung	135
5.10.2.4	Synthese der c-RNA	136

5.10.2.5	Zweite RNA-Isolierung	136
5.10.2.6	Qualitätskontrolle der t-RNA und Hybridisierung auf den Chips	137
5.10.2.7	Auswertung der GeneChip-Daten	137
5.11	LIGHTCYCLER-PCR	138
5.11.1	<i>Abtrypsinieren und Zählen der Zellen mit Trypanblau</i>	139
5.11.2	<i>Zellaufschluss mit Tri-Reagent</i>	140
5.11.3	<i>Extraktion und Fällung der RNA</i>	140
5.11.4	<i>Reverse Transkription</i>	141
5.11.5	<i>LightCycler-PCR</i>	141
5.11.5.1	Gelelektrophorese	142
5.11.5.2	Primerpaare	143
5.11.5.3	Auswertung der Ergebnisse	145
5.12	STATISTIK	145
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG ZU DEN ERGEBNISSEN</b>	<b>160</b>
8.1	GENEXPRESSIONSÄNDERUNGEN BEIM CLONTECH-ARRAY	160
8.2	GENEXPRESSIONSÄNDERUNGEN BEI DEN AFFYMETRIX-GENECHIPS	164



# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Befunde mit feinen und ultrafeinen Aerosolen - akute und chronische Effekte

In den vergangenen 10 Jahren wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien erkannt, dass partikuläre Verunreinigungen in der Atmosphäre an der Entstehung akuter und chronischer Erkrankungen beteiligt sind. Andere Untersuchungen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Partikelkonzentration (PM<sub>10</sub>) und respiratorischen Erkrankungen bei Kindern (Schwartz et al., 1994). In der sogenannten Six-City-Study konnte bei der PM<sub>2.5</sub>-Fraktion die stärkste Assoziation mit der täglichen Sterberate gezeigt werden (Schwartz et al., 1996). Laden und Kollegen berichteten von steigenden Mortalitäten in urbanen Umgebungen der USA in Assoziation mit feinen Partikeln aus Verbrennungsprozessen (Laden et al., 2000).

Peters et al. schlossen aus einer in den neuen Bundesländern durchgeführten Asthmastudie, dass von der ultrafeinen Fraktion der Umweltpartikel ein höheres Erkrankungsrisiko ausgeht als von der feinen Fraktion (Peters et al., 1997). Hier konnte ein Zusammenhang zwischen einer verschlechterten Lungenfunktion sowie akuten Symptomen in den Atemwegen und der Teilchenkonzentration aufgezeigt werden. Der Einfluss der Partikelkonzentration bzw. Partikelmasse im Umweltaerosol auf die Häufigkeit der Anwendung von Asthmamedikamenten wurde in einer weiteren Studie untersucht. Das Auftreten der Symptome korrelierte mit der Konzentration von Partikeln im Umweltaerosol; für die Medikation konnten ebenfalls Korrelationen gefunden werden, die jedoch weniger deutlich auftraten (von Klot et al., 2002).

Eine große europäische Studie (ULTRA-Studie) fand einen Zusammenhang zwischen respiratorischen und kardiovaskulären Effekten und feinen (unter 2,5 µm) sowie ultrafeinen Partikeln (de Hartog et al., 2003). Zum selben Resultat kamen Wichmann et al. bei einer Studie, die sich mit dem Anstieg der Mortalität durch feine und ultrafeine Partikel befasste (Wichmann et al., 2000). Partikel mit unterschiedlicher Größe verursachten in umweltrelevanten Konzentrationen unabhängige Effekte. Hierbei war der Bezug zu

respiratorischen Erkrankungen deutlicher erkennbar als derjenige zu kardiovaskulären Erkrankungen.

Einige epidemiologische Studien fokussieren derzeit schwerpunktmäßig das kardiovaskuläre Risikoprofil von feinen und ultrafeinen Partikeln, die aus den Atemwegen in die Zirkulation aufgenommen werden. So konnten erhöhte Werte der Plasmapviskosität als Risikofaktor für Herzinfarkt (Peters et al., 1997), das C-reaktive Protein als Entzündungsmarker (Peters et al., 2001) und Blutdruckerhöhungen (Ibald-Mulli et al., 2001) mit den gemessenen Partikelkonzentrationen korreliert werden. Pope et al. zeigten eine Verbindung zwischen kardiovaskulären Effekten durch partikuläre Luftverschmutzung und veränderten mittleren Herzfrequenzen (Pope et al., 1999).

In den letzten Jahren wurde die gesundheitliche Problematik von Aerosolen weitgehend erkannt und in Folge dessen auf die Senkung der Emission von Partikeln in die Umwelt geachtet. Erfolgreich war diese Bestrebung vor allem für die in der Massenkonzentration dominierende PM10-Aerosolfraktion. In der Europäischen Union gilt gegenwärtig eine Richtlinie für die Qualität der Luft von  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Jahresmittel für PM10. Die amerikanische Umweltbehörde Environmental Protection Agency (EPA) hat für PM2.5 einen Grenzwert von  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  eingeführt. Da kleinere Partikel in der Massenbetrachtung eine geringe Bedeutung haben, werden lungengängige ultrafeine Partikel vernachlässigt. Zusätzlich sorgte der „Scavenging Effekt“, der die Anlagerung von ultrafeinen Partikeln an feine und grobe Partikel beschreibt, dafür, dass nach der verminderten Emission von groben Partikeln die relative Anzahlkonzentration der ultrafeinen Teilchen sogar ansteigt.

Für die Zukunft wird eine Verminderung der Emission von uf-Partikeln von zunehmender Bedeutung sein. Hinsichtlich der Aufklärung von Wirkungsmechanismen bei akuten und chronischen Effekten in der Lunge und im Herz-Kreislauf-System, die durch uf-Partikel bedingt sind, ist noch erheblicher Forschungsbedarf vorhanden.

## **1.2 Atmosphärische Aerosole und ihre Interaktion mit dem Atemtrakt**

### **1.2.1 Gasförmige und partikuläre Verunreinigungen**

Verunreinigungen in der Atemluft setzen sich aus partikulären und gasförmigen Stoffen zusammen. Partikuläre Strukturen sind fest oder flüssig und entstehen bei

Verbrennungsprozessen oder sind biogener Natur. Zu den Gasen gehören Stickoxide ( $\text{NO}_x$ ), Schwefeldioxid ( $\text{SO}_2$ ), Kohlenmonoxid und Kohlendioxid, sowie flüchtige Kohlenwasserstoffe. Da Gase mit geringerem messtechnischen Aufwand zu detektieren sind, dienen sie oft als Marker für die Schadstoffbelastung der Luft. Für die vorliegende Studie ist dagegen der partikuläre Anteil der Verunreinigungen im Umweltaerosol von Interesse. Die Partikel werden im Atemtrakt deponiert und verursachen Effekte, die den Organismus beeinträchtigen können.

### 1.2.2 Quellen der partikulären Noxen

Ultrafeine primäre Partikel entstehen vor allem aus anthropogenen Quellen bei der Verbrennung von Erdöl, Holz und Kohle. In sekundären Prozessen verbinden sich diese zu größeren Aggregaten. Durch Abrieb oder Aufwirbelung können feine Partikel in das Umweltaerosol gelangen. Aus natürlichen Quellen kommende grobe Partikel sind aufgewirbelter Staub in trockenen Gebieten, Meersalzkerne durch aufgewirbelte Gischt der Ozeane und Partikel, die bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden entstehen.

### 1.2.3 Physikalisch-chemische Charakteristika partikulärer Verunreinigungen

In atmosphärischem Aerosol vorkommende Partikel lassen sich in verschiedene Größenklassen einteilen, die sich in ihrer physikalischen und chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Eine wichtige Größe ist der aerodynamische Durchmesser, der wesentlich die Aufenthaltsdauer feiner Partikel in der Atmosphäre und ihre Deposition durch Sedimentation und Impaktion bestimmt. Uf-Partikel werden vor allem durch Diffusion deponiert.

Tab. 1. Klassifizierung von Partikelgrößen aus PM10.

Partikelgrößenbezeichnung	Durchmesser
Grob	$> 2,5 \mu\text{m}$
Fein	$< 2,5 \mu\text{m}$
Ultrafein	$< 0,1 \mu\text{m}$

Man unterscheidet drei Größenbereiche der inhalierbaren Partikel (PM10) im Aerosol: Grobe Partikel haben einen aerodynamischen Durchmesser von über 2,5  $\mu\text{m}$ , feine sind kleiner als 2,5  $\mu\text{m}$  und ultrafeine Partikel kleiner als 0,1  $\mu\text{m}$  (Tab. 1).

Eine Besonderheit der uf-Partikel im atmosphärischen Aerosol wird in Abb. 1 bei der Betrachtung der Anzahl- und Massenkonzentrationsdichte der feinen Fraktion PM2.5 deutlich. Während die Anzahlkonzentration vor allem durch Partikel, die kleiner als 0,1  $\mu\text{m}$  sind, getragen wurde, wurde die Massenkonzentration am stärksten von 0,1 bis 0,5  $\mu\text{m}$  großen Partikeln beeinflusst (Tuch et al., 1997). In ihrer Gesamtheit weisen uf-Partikel folglich eine sehr große spezifische Oberfläche auf, die gegenüber biologischen Systemen eine hohe Reaktivität zeigt.

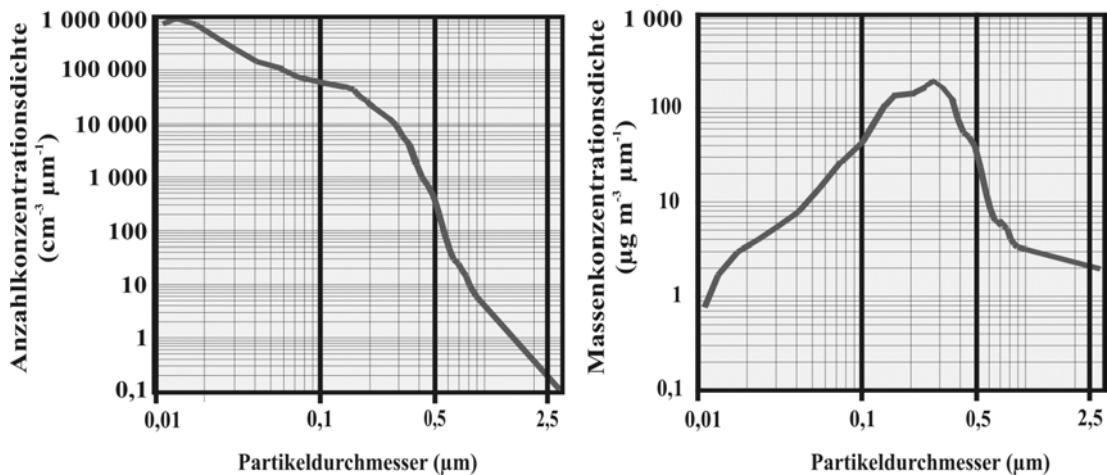


Abb. 1. Anzahl- und Massenkonzentrationsverteilung von Umweltpartikeln in PM2.5 nach Tuch et al. (1997).

Eine weitere Studie, die für die Charakterisierung der ultrafeinen Partikel nach ihrer Anzahl und nicht nur nach ihrer Masse spricht, stammt von Peters et al. (1997). Im Umweltaerosol an einem städtischen Standort fanden sie nur 1 % der Partikelmasse in der feinen Partikelfraktion ( $< 2,5 \mu\text{m}$ ) durch uf-Partikel vertreten, die jedoch 73 % der Partikelanzahl ausmachten (Tab. 2). Partikel zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{m}$  waren zu 27 % an der Anzahl und zu 82 % an der Masse der feinen Partikelfraktion beteiligt.

Die chemischen Komponenten der Partikel setzen sich aus primär emittierten sowie sekundär gebildeten Anteilen zusammen. Uf-Partikel bestehen meist aus einem Kern aus Kohlenstoff oder Metallverbindungen und einer ankondensierten Hülle, die sich bei



Erwärmung wieder verflüchtigen kann. Oft liegen Agglomerate der gebildeten Primärpartikel vor.

Tab. 2. Verhältnis von Partikelmasse und Partikelanzahl eines Aerosols, gemessen an einem städtischen Standort, nach Peters et al. (1997).

Größenbereich	Anteil an Partikelanzahl	Anteil an Partikelmasse
0,01-0,1 $\mu\text{m}$	73 %	1 %
0,1-0,5 $\mu\text{m}$	27 %	82 %
0,5-2,5 $\mu\text{m}$	0,01 %	17 %

Kohlenstoff in elementarer oder organischer Form entsteht bei unvollständigen Verbrennungsprozessen. Über diese gelangen auch Schwermetalle in das atmosphärische Aerosol. Sekundär setzen sich auf den Partikeln Substanzen wie Sulfat aus Schwefeldioxid, Nitrat aus Stickoxid oder Ammonium aus Ammoniak ab.

#### 1.2.4 Partikuläre Komponenten werden im Atemtrakt deponiert

An welcher Stelle im Atemtrakt ein Partikel deponiert wird, ist zunächst vom Durchmesser des Partikels und dessen Dichte abhängig. Für Partikel, die durch Sedimentation deponiert werden, kann der aerodynamische Durchmesser herangezogen werden. Der aerodynamische Durchmesser eines Partikels ist der Durchmesser einer Sphäre mit einer Einheits-Dichte, das durch Sedimentation gleich schnell absinkt wie das zu charakterisierende Teilchen (Heyder and Svartengren, 2001).

Die Gesamtabcheidung von Partikeln mit 10 nm Durchmesser im Atemtrakt liegt unter den angegebenen Atembedingungen bei ungefähr 80 % (Abb. 2). Bei einer Zunahme der Größe auf 200 - 300 nm sinkt die Totaldeposition bis unter 20 % ab. In diesem Größenbereich werden die meisten Partikel exhaliiert. Nach dem Minimum steigt die Depositionskurve mit zunehmendem Partikeldurchmesser wieder an und erreicht bei 10  $\mu\text{m}$  erneut circa 80 %. Für 10- $\mu\text{m}$ -Partikel findet die Deposition vor allem im Hals-Rachen-Bereich durch Impaktion statt. Feine Partikel gelangen in tiefe Regionen des Atemtraktes, wobei die ultrafeine Fraktion vor allem durch Diffusion und die feine Fraktion durch Sedimentation und Impaktion deponiert wird.

Für die *in-vitro*-Exposition von Epithelzellen des Alveolarbereichs ist demnach ein ultrafeines Aerosol besonders gut geeignet, um die *in-vivo*-Deposition dieser Partikel in den menschlichen Alveolen nachzuahmen (Abb. 2, Bereich 4). Die ebenfalls in diesem Bereich abgelagerten feinen Partikel werden vornehmlich durch Alveolarmakrophagen erkannt und eliminiert. Zusätzlich werden sie langsamer als kleine Partikel in Epithelzellen aufgenommen (siehe 1.3.1.5).

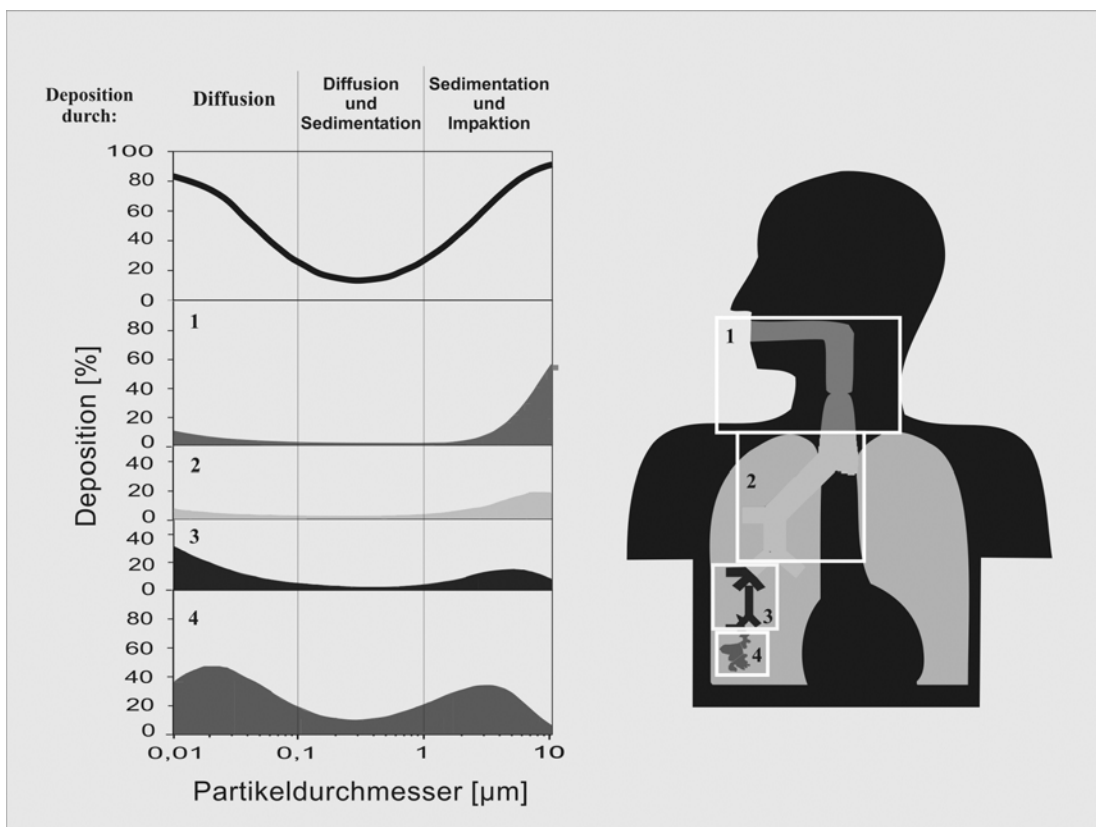


Abb. 2. Deposition von Partikeln unterschiedlicher Größe bei Mundatmung in der Lunge, mittlerer Atemfluss  $250 \text{ cm}^3$  pro Sekunde; Atemzyklus 8 Sekunden, 1: extrathorakaler Bereich, 2: trachealer Bereich, 3: bronchialer Bereich, 4: alveolärer Bereich; nach Heyder et al. (1986).

### 1.2.5 Funktion des Atemtrakts

Die Aufgabe des Respirationstraktes besteht darin, lebenswichtigen Sauerstoff aufzunehmen und das im Organismus gebildete Kohlendioxid abzugeben. Die eingeatmete Luft gelangt beim Menschen physiologischerweise durch die Nase, wo sie befeuchtet und von groben Partikeln gereinigt wird, in die Trachea und von dort in den sich verästelnden Bronchialbaum der Lunge. Trachea und Bronchien tragen an ihren Innenwänden ein mit

Flimmerhärchen besetztes Respirationsepithel. Das Respirationsepithel ist von einer viskosen Flüssigkeit, dem Mucus, bedeckt. Über das Bronchialsekret findet ein oral gerichteter Transport von abgelagerten Partikeln statt, der als mukoziliäre Clearance bezeichnet wird. Die kleineren Bronchien verzweigen sich in Bronchioli, die sich wiederum aufspalten und in den Alveolargängen münden. Diese stehen in Verbindung mit den Lungenbläschen, den Alveolen. Jenseits der Broncheoli wird das Epithel zunehmend flacher und geht schließlich in das Alveolarepithel über. An der Grenzschicht zur Luft befindet sich ein Surfactant-Film, der die Oberflächenspannung mindert, um das Kollabieren der Alveolen zu verhindern. Damit ein schneller Gasaustausch stattfinden kann, sind die 200 µm großen Alveolen von einem dichten Kapillarnetz umgeben. Es wird diskutiert, ob partikuläre Strukturen, in Abhängigkeit von Größe und Zusammensetzung, möglicherweise durch das Alveolarepithel in den Blutkreislauf gelangen und so systemische Wirkungen entfalten können.

### **1.3 Interaktion von Partikeln mit Epithelzellen und biologische Konsequenzen**

Bisher wurden Partikelwirkungen *in-vitro* vor allem in monozytären Zellen untersucht, da sie die deponierten Partikel phagozytieren und auf diese Weise mit den Noxen in Wechselwirkung treten können (Becker et al., 2003; Beck-Speier et al., 2003; Hofer et al., 2004).

Uf-Partikel beeinflussen die Immunantwort der Lunge auch unter Beteiligung des respiratorischen Epithels, wie in einer Studie von Li et al. (2002) gezeigt worden ist. Die von DEP extrahierten organischen Verbindungen beeinflussten die HO1-Expression, aktivierten die c-Jun-N-terminal-Kinase-Kaskade, steigerten die IL8-Produktion und induzierten außerdem zytotoxische Effekte. Epithelzellen produzierten in dieser Studie vermehrt Superoxid-Radikale und waren gegenüber zytotoxischen Effekten suszeptibler als Makrophagen (Li et al., 2002c). In humanen alveolären Epithelzellen (A549) bewirkte die Exposition mit Partikeln der PM2.5-Fraktion eine dosis- und zeitabhängige Freisetzung von TNF und IL6 (Calcabrini et al., 2004). Diamond et al. (2000) beschrieben die immunologische Reaktion von Epithelzellen des Respirationstraktes auf eingeatmete und deponierte Mikroorganismen. Dabei spielten antimikrobielle Peptide und die chemotaktische Anlockung von Phagozyten eine Rolle. Diese Mechanismen könnten nach den Autoren auch

durch deponierte Partikel aus Umweltaerosolen getriggert werden und so eine erhöhte Suszeptibilität für chronische Infektionen bewirken.

Das alveoläre Epithel wurde in den letzten Jahren zunehmend in die Antwort der Lunge auf inhalede Noxen einbezogen und wurde in der vorliegenden Studie nach Exposition mit uf-EC-Partikeln untersucht.

### **1.3.1 Welche Partikeleigenschaften können relevant sein?**

Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien haben sich mit Entzündungsprozessen befasst, die durch Partikel oder partikelgebundene Verunreinigungen ausgelöst wurden. In den meisten Fällen wird die biologische Wirkung auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Substanzen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) oder Chinone, die sich auf den Partikeln befinden, zurückgeführt. Des Weiteren spielen die ROS-Bildung durch physikochemische Eigenschaften der Partikeloberfläche und Partikelmatrix sowie pathophysiologische Reaktionen der Zelle auf die Partikel eine Rolle.

#### **1.3.1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe**

Polyzyklische aromatische Kohlenstoffe sind ubiquitär auf Umweltpartikeln vorkommende Kontaminationen. Bei der Sammlung von atmosphärischem Aerosol auf Filtern geht ein beträchtlicher Anteil der partikelgebundenen PAHs verloren, so dass der Gehalt an PAHs von städtischem PM-Material oft unterschätzt wird (Schauer et al., 2003). In einer Studie an alveolären Epithelzellen bewirkte der auf DEP vorkommende polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Pyren für IL8 einen Anstieg der Promotoraktivität, m-RNA-Expression und Proteinbildung (Bommel et al., 2003). PAHs in Kombination mit partikulärem Eisenoxid zeigten sowohl *in-vitro* in A549-Epithelzellen (Garcon et al., 2001b) als auch *in-vivo* in Sprague-Dawleyratten (Garcon et al., 2001a) stärkere Effekte als PAHs oder Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> alleine. Während *in-vitro*-Veränderungen bei Redox-assoziierten Prozessen beobachtet wurden, war *in-vivo* die Lipidoxidation und die Bildung von inflammatorischen Mediatoren durch PAHs auf Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> im Vergleich zu den Einzelkomponenten signifikant erhöht.

### **1.3.1.2 Chinone**

Chinone sind ein wesentlicher Bestandteil der auf DEP adsorbierten organischen Verbindungen. Ihre Beteiligung an Partikeleffekten wurde vielfach untersucht, da Chinone die Generierung von ROS katalysieren können. Kumagai und Kollegen (2002) konnten in ihren Untersuchungen eine Phenanthrenchinon-vermittelte Oxidation von Sulfhydryl-Gruppierungen in Proteinen nachweisen. In einer anderen Studie wurde die Zytotoxizität von Chinonen in Hepatom-Zellen durch Radikalbildung gezeigt (Flowers-Geary et al., 1996).

### **1.3.1.3 Metalle**

Auch die Rolle von Übergangsmetallen an der Antwort von respiratorischen Epithelzellen auf partikuläre Noxen wird in der Literatur diskutiert. Flugasche aus einer Müllverbrennungsanlage mit Partikeln  $< 20 \mu\text{m}$  mit einem Anteil an uf-Partikeln an der gesamten Partikelkonzentration von 31 % verursachte eine konzentrationsabhängige Bildung von ROS in Epithelzellen der Rattenlunge (Voelkel et al., 2003). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe eines Metallchelators deutlich reduziert werden. Smith et al. (2000) führten die erhöhte IL8-Expression durch Flugasche in humanen Epithelzellen auf den beträchtlichen Eisengehalt der Partikel zurück, da auch hier der Effekt durch Zugabe eines Metallchelators inhibierbar war. Die Freisetzung von IL8 aus humanen bronchialen BEAS-2B-Zellen korrelierte in einer Studie von Huang et al. (2003) mit dem Mangan-Gehalt des Aerosols, wohingegen die Freisetzung von TNF aus murinen RAW-264.7-Makrophagen mit dem Eisen- und Chromgehalt einher ging.

### **1.3.1.4 Matrix**

Der Einfluss der Partikelmatrix auf den Effekt in biologischen Systemen wird kontrovers diskutiert. In der in 1.3.1.3 erwähnten Studie von Huang und Kollegen wurden neben dem Metallgehalt auch der Gehalt an elementarem und organischem Kohlenstoff mit den beobachteten Effekten in Verbindung gebracht. Beide korrelierten mit der Lipidoxidation in BEAS-2B-Zellen, während eine solche Korrelation für die untersuchten Metalle nicht vorhanden war. Die Produktion von Zytokinen war bei dieser Studie jedoch nicht vom Kohlenstoffgehalt der Partikel abhängig. Bei einer anderen Untersuchung wurde ein Mediumextrakt von Umweltpartikeln ( $< 10 \mu\text{m}$ ) mit der Partikelfraktion hinsichtlich der

biologischen Wirkung verglichen (Fujii et al., 2001). In primären humanen Bronchialzellen löste die Inkubation mit 100 µg/ml der Partikelfraktion eine deutlich erhöhte IL8- und IL1 $\alpha$ -m-RNA-Expressionen aus. In derselben Arbeit konnten auch bei der Verwendung von Kohlenstoffpartikeln (kolloidaler Kohlenstoff, Fount India Tusche, Pelikan) Erhöhungen der IL8- und IL1 $\alpha$ -Expression festgestellt werden. Bei einer Behandlung der Zellen mit der löslichen Partikelfraktion trat dieser Effekt jedoch nicht auf.

Partikel aus elementarem Kohlenstoff (carbon black, CB) werden häufig als Modellpartikel eingesetzt, um Effekte der Partikelmatrix zu studieren. Solche Partikel haben in der Regel einen geringen Anteil an organischen Komponenten und einen niedrigen Metall-Gehalt. Nach Inhalationen mit ultrafeinem CB von Ratten wurden in der bronchoalveolären Lavage (BAL) vermehrt Neutrophile und in den BAL-Zellen allgemein eine erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins MIP-2 $\alpha$  nachgewiesen (Gilmour et al., 2004). Baulig et al. (2003) verglichen Effekte in bronchialen Epithelzellen, die durch standardisierte Umweltpartikel, gesammelte Umweltpartikel, DEP und CB-Partikel ausgelöst wurden. DEP und in schwächerem Ausmaß auch Umweltpartikel lösten die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF aus und erhöhten die intrazelluläre Peroxid-Produktion. Beides konnte für CB-Partikel nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Studie steht der Effekt der Partikelmatrix aus elementarem Kohlenstoff im Vordergrund. Jedoch kann ein Anteil an organischen Bestandteilen auf den Partikeln von ca. 6 % nicht ausgeschlossen werden (siehe 1.4.4).

### **1.3.1.5 Größe**

Die Bindung und Aufnahme von Partikeln durch Targetzellen ist eine essentielle Voraussetzung für eine potentielle biologische Wirkung. Von alveolären Epithelzellen der Ratte wurden mehr 15-nm-Latexpartikel als Partikel mit größerem Durchmesser aufgenommen (Griese and Reinhardt, 1998). In bronchialen Bürsteneithelzellen wurde durch ultrafeine Umweltpartikel vermehrt GM-CSF gebildet, nicht jedoch durch dieselbe Masse feiner Partikel (Reibman et al., 2002). Auch bei Instillationsexperimenten mit Ratten ergaben sich Unterschiede zwischen feinen und ultrafeinen Partikeln. Dabei bewirkten ultrafeine TiO<sub>2</sub>- bzw. CB-Partikel eine verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen, einen vermehrten

Anteil an zerstörten Epithelzellen und eine höhere Zytotoxizität als die in gleicher Masse eingesetzten feinen Partikel (Renwick et al., 2004).

Eine neue, dazu widersprüchliche Studie aus Oslo (Hetland et al., 2004) verglich die grobe Fraktion von PM10 mit der feinen und ultrafeinen Fraktion. In humanen A549-Zellen und primären Rattenepithelzellen zeigte eine definierte Masse der groben Fraktion näherungsweise die gleiche Wirkungspotenz wie die entsprechende Masse der kleineren Partikelfraktion bezüglich Toxizität und Induktion der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL8/ MIP-2 $\alpha$  und IL6.

### **1.4 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen in alveolären Epithelzellen**

*In-vitro*-Studien sind immer mit Kompromissen verbunden, da komplexe biologische Vorgänge in vereinfachten Modellen nachgestellt werden sollen. Dabei werden zelluläre Mechanismen untersucht, die *in-vivo* in ein Netzwerk verschiedener biologischer Reaktionen eingebunden sind.

#### **1.4.1 Exposition von submersen Kulturen mit suspendierten Partikeln**

Expositionen von submersen *in-vitro*-Kulturen mit suspendierten Partikeln werden von vielen Forschergruppen als Standardverfahren bevorzugt. Es handelt sich um eine schnelle und einfache Methode, die zudem unabhängig von einer online-Partikelgeneration ist.

Ein gravierender Nachteil bei der Exposition mit suspendierten Partikeln ist jedoch die Unkenntnis über die genaue Teilchendosis. Die Korrelation von Wirkung und Teilchengröße ist kaum möglich, da die Partikel in Suspension in Abhängigkeit vom Ladungszustand unterschiedlich große Agglomerate bilden. Ein weiterer Aspekt sind chemische Interaktionen mit organischen Verbindungen, die auf der Partikeloberfläche adsorbiert sind. Diese Verbindungen können sich im Nährmedium von den Partikeln ablösen und unabhängig von den Partikeln in die Zellen gelangen und dort Effekte auslösen. Zusätzlich können Komponenten aus den Filtern, mit denen die Partikel gesammelt wurden, zu deren Kontamination beitragen und möglicherweise die biologische Antwort beeinflussen (Dick et al., 2000).

### 1.4.2 Exposition membranständiger Kulturen an der Luft-Medium-Grenzschicht

Die Exposition von Zellen mit luftgetragenen Partikeln ist im Gegensatz zur submersen Exposition ein realitätsnaher Ansatz.

Eine solche *in-vitro*-Exposition an der Luft-Medium-Grenzschicht (LMG) kann auf verschiedene Weise realisiert werden. Targetzellen können mit Hilfe der „Bubble-Kultur“ in Kontakt mit Partikeln kommen (Konings, 1986; Wirtz and Schmidt, 1996). Die Methode ist als Übergang zwischen submerser Exposition und Exposition an der LMG anzusehen. Bei der „Wechselkultur“ wachsen die Zellen am Boden eines Kulturgefäßes aus dem zeitweise das Medium abgesaugt und das Aerosol zugegeben wird. Nach einer definierten Zeit wird wieder Medium zur Versorgung der Zellen zugegeben. Ähnlich funktioniert die Kultur in Rollflaschen (Banks et al., 1990; Bolton et al., 1982; Pace et al., 1961). Die Zellen werden dabei periodisch für ein definiertes Zeitintervall luftgetragenen Partikeln ausgesetzt.

Eine Exposition an der LMG auf semipermeablen Membranen ist die beste, bisher beschriebene *in-vitro*-Simulation der *in-vivo*-Situation respiratorischer Epithelzellen. Die Zellen werden von der basalen Seite durch die Poren hindurch mit Nährmedium versorgt, während die Exposition mit den luftgetragenen Partikeln von der apikalen Seite her stattfindet. Nach diesem Verfahren erfolgten in der Vergangenheit Untersuchungen über den Einfluss von Ozon auf die Zytokinproduktion an Kokulturen von humanen Epithel- und Endothelzellen (Mogel et al., 1998). Ebenso wurde die Viabilität und das Glutathionverhältnis bei humanen Epithelzellen nach Exposition mit Gasen in der CULTEX-Kammer (Ritter et al., 2001) und die Wirkung von uf-Partikeln aus Motoremissionen (Cheng et al., 2003a) oder Zigarettenrauch (Aufderheide et al., 2001; Fukano et al., 2004) auf Epithelzellen studiert. Der Nachteil aller bisher etablierten Systeme für die Exposition mit luftgetragenen uf-Partikeln ist die fehlende Partikeldosimetrie, so dass sich Dosis-Wirkungsbeziehungen nur unzulänglich mit anderen Methoden vergleichen lassen.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, neu etablierten Expositionssystem (Abb. 3) handelt es sich um eine Versuchsanordnung, bei der sowohl die Anzahl als auch die Größe der auf den Zellen an der LMG gleichmäßig deponierten Partikel genau bestimmt werden kann (Tippe et al., 2002). A549-Epithelzellen werden auf semipermeablen Aluminiumoxid-Membranen (Anodisk, Whatman) kultiviert und an der LMG mit uf-EC-Partikeln exponiert.



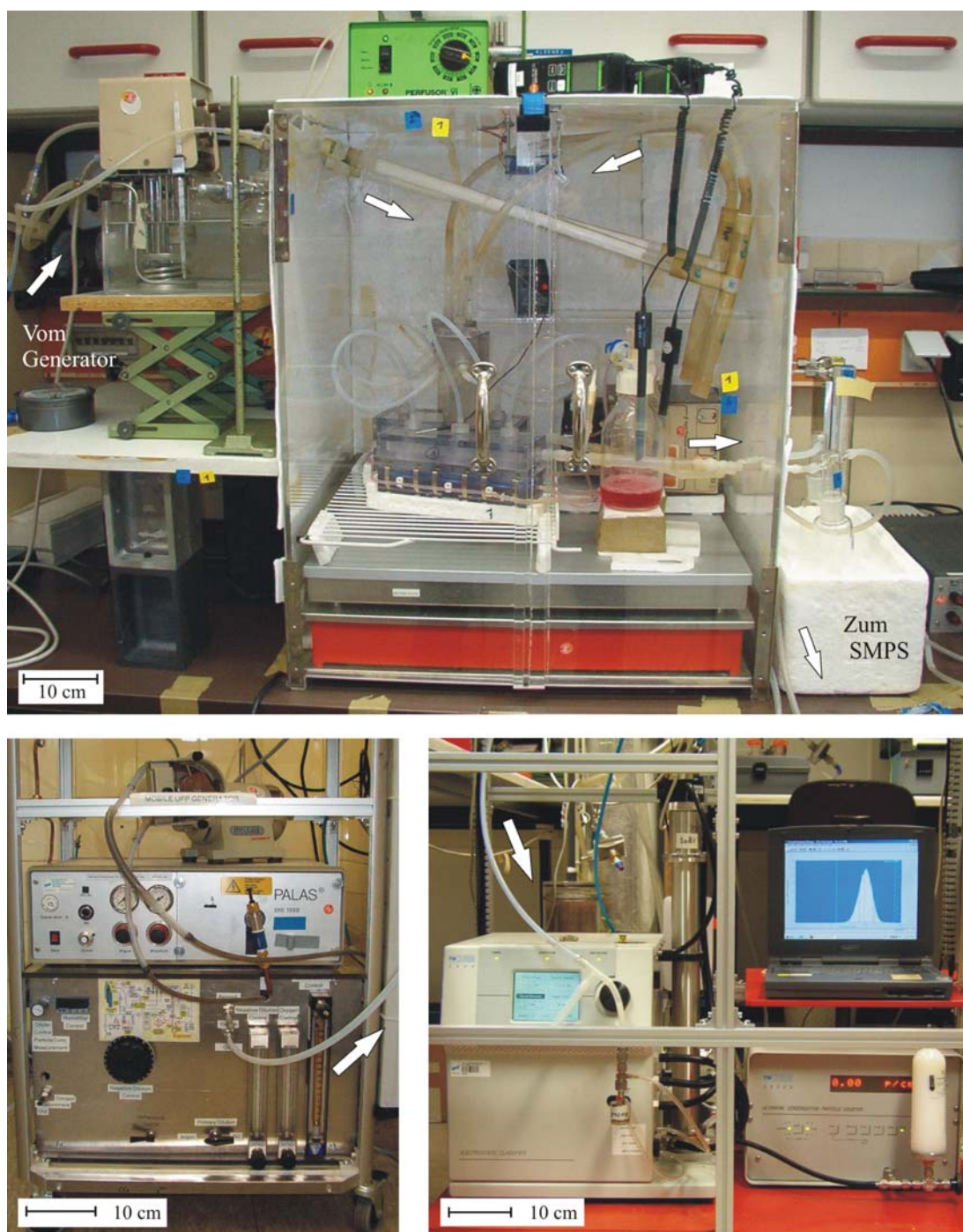


Abb. 3. Expositionskammersystem (oben); Palas-GFG1000-Funkengenerator mit Verdünnungssystem (links); SMPS 3080, Scanning-Mobility-Particle-Sizer und CPC 3025, Kondensationskernzähler (rechts). Die Pfeile zeigen die Richtung des Aerosolflusses an.

### 1.4.3 Partikelkonzentration und Dosimetrie

Bei *in-vitro*-Expositionen ist es empfehlenswert, realistische Konzentrationen an Partikeln einzusetzen. Für submerse Expositionen sind Ansätze mit Partikelkonzentrationen von 1 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pro  $10^6$  Zellen üblich. Betrachtet man Standorte in städtischer Umgebung mit hohem Verkehrsaufkommen, so könnten diese Partikelkonzentrationen durchaus relevant sein. 30 Meter in Windrichtung einer stark befahrenen Straße als Emissionsquelle wurde eine mittlere Partikelmasse von Kohlenstoffpartikeln (carbon black) von 3,4 - 10,0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , eine mittlere Partikelanzahl von 1,3 - 2,0  $\times 10^5$  Partikel/ $\text{cm}^3$  und eine mittlere Massenkonzentration von 30,2 - 64,6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  gemessen (Zhu et al., 2002). Beim Menschen können die durch Inhalation aufgenommenen Partikel innerhalb von 24 h zu einer Gesamtmenge von bis zu 500 - 2.000  $\mu\text{g}$  akkumulieren. Bei einem geschätzten Volumen an Epithelflüssigkeit von 40 - 50 ml beim Menschen (Hofer et al., 2004) liegt die akkumulierte Partikelmasse zwischen 10 und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Bei submersen Expositionen sind Effekte häufig erst im höheren Dosierungsbereich (30 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu finden. Die eingesetzte Massenkonzentration entspricht in diesen Ansätzen nicht zwangsläufig der Dosis, die auf die Zellen trifft. Letztere ist bei den Agglomeraten der submersen Expositionen kaum quantifizierbar. Je nach Größe der Agglomerate deponieren sie vermehrt durch Sedimentation oder Diffusion. Die eingesetzte Menge an Partikeln ist daher keinesfalls mit der effektiven Dosis für die Zellen identisch. Dennoch müssen solche Konzentrationsangaben bei submersen Experimenten gemacht werden, da sie die einzigen greifbaren Parameter sind.

### 1.4.4 Eigenschaften von Umweltaerosolen und Modellpartikeln

Um Partikelkonzentrationen in der Umwelt zu studieren, werden definierte Aerosolmengen angesaugt und die Partikel mittels Impaktoren auf Filtern gesammelt. Die separierten Fraktionen können gravimetrisch bestimmt und anschließend für Expositionen von Zellen eingesetzt werden. Die so gesammelten Umweltaerosole stellen immer komplexe Gemische dar. Sie sind inhomogen in der Größenverteilung, Anzahl- und Massenkonzentration der enthaltenen Partikel (siehe auch Abb. 1). Die Beladung der Partikel mit organischen Kohlenwasserstoffen, Sulfaten oder Nitraten variiert von Probe zu Probe stark. Meteorologische Faktoren beeinflussen zusätzlich die Herkunft und das Alter von Aerosolpartikeln. Die Konzentration vor allem der *uf*-Partikel im Umweltaerosol schwankt stark zwischen Sommer und Winter (Wichmann et al., 2000). Sie ist unter der Woche höher

als am Wochenende und steigt während der verkehrsreichen Stunden stark an, was eine vorrangige Emission der uf-Partikel durch den Kfz-Verkehr nahelegt. Die Effekte aus Expositionen mit Umweltpartikeln, die an verschiedenen Standorten zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt wurden, sind daher nur schwer zu vergleichen.

Modellaerosole sind weniger komplex und können standardisiert hergestellt werden. Unter festgelegten Bedingungen können sie im Labor mit reinen Elektroden in einem Funkengenerator erzeugt werden. Die Reproduzierbarkeit bezüglich des Partikelgrößenspektrums ist deutlich besser als bei den Umweltaerosolproben. Die Größenverteilung der Partikel kann auf einen engen Bereich begrenzt und so der Einfluss der Partikelgröße auf die Wirkung bestimmt werden. Die Aerosolpartikel werden hierfür mit einem Diffusion-Mobility-Analyser (DMA) in einem SMPS in einzelne Größenfraktionen getrennt und mit einem CPC gezählt. Jedoch können auch hier Probleme auftreten. Sobald die Partikel in Kontakt mit Raumluft kommen, reagieren sie mit Komponenten aus der Gasphase, so dass auch bei Modellpartikeln die Beladung ein kritischer Faktor bleibt. Nur bei einer Generierung und Verdünnung mit reinsten synthetischen Gasen lässt sich dieser Effekt minimieren.

Das im GSF-Institut für Inhalationsbiologie mit dem Funkengenerator generierte ultrafeine Aerosol aus elementarem Kohlenstoff enthält nach Roth et al. (2004) etwa 6 % Verunreinigungen mit organischen Substanzen. Es aggregiert aus 5 – 10 nm großen Primärpartikeln zu 75 – 90 nm großen Agglomeraten. Diese uf-Partikel haben nach BET eine spezifische Oberfläche von ca. 750 m<sup>2</sup>/g (Roth et al., 2004). Uf-EC-Partikel können als Modellpartikel für die Matrix von Dieselruß betrachtet werden (Berube et al., 1999). Neben der großen spezifischen Oberfläche zeigten EC-Partikel ein oxidatives Potential, das durch die Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid in wässriger Suspension quantifiziert wurde (Beck-Speier et al., 2002). Anhand von Messungen der Elektronenspin-Resonanz (ESR) konnten die Autoren außerdem zeigen, dass uf-EC-Partikel eine Matrix-assoziierte Radikalstruktur besitzen, die einen Teil des oxidativen Potentials ausmachen könnten. An der hohen spezifischen Oberfläche der uf-Partikel adsorbierter Luftsauerstoff macht ebenfalls einen Teil des ESR-Signals aus, das jedoch nach "Alterung" der Partikel in Suspension zurückgeht.

### 1.4.5 Targetzellen

Im alveolären Bereich der menschlichen Lunge sind eine Vielzahl von Zelltypen anzutreffen. Von ihnen kann man 8 % den Typ-I-Epithelzellen, 16 % den Typ-II-Epithelzellen, 30 % den Endothelzellen der Kapillaren und 37 % den Zellen des Interstitiums und den Makrophagen zuordnen. Der Anteil der Letzteren ist mit 3 - 19 % stark schwankend (Crapo et al., 1982). In der einzelnen Alveole gibt es ein bis wenige Alveolarmakrophagen.

Alveolarmakrophagen sind für die Phagozytose von im Alveolarbereich deponierten Partikeln verantwortlich. Mit abnehmendem Durchmesser der abgelagerten Partikel sinkt ihre Wahrscheinlichkeit auf Alveolarmakrophagen zu treffen und von ihnen phagozytiert zu werden. Der in den Bronchien und oberen Atemwegen mögliche Abtransport über die mukoziliäre Clearance entfällt, da das Alveolarepithel im Gegensatz zum Bronchialepithel über keine Zilien verfügt. Eine möglicher Weg zur Entsorgung der uf-Partikel aus den Alveolen führt über die Epithelbarriere hinweg in den Blutkreislauf. Dies könnte die Beeinflussung von kardiovaskulären Effekten zur Folge haben, die von der Epidemiologie in Abhängigkeit von Partikelkonzentrationen beschrieben wurden (de Hartog et al., 2003).

Wichtige Zielzellen für inhalierte ultrafeine Teilchen sind insbesondere alveoläre Epithelzellen. Epithelzellen vom Typ-I bilden aufgrund ihrer flachen und langgestreckten Struktur den Großteil der Alveolaroberfläche aus. Im Gegensatz dazu tragen die kuboidalen Typ-II-Epithelzellen, die zwischen den Typ-I-Epithelzellen verteilt sind, nur ca. 7 % zur alveolären Oberfläche bei. Typ-II-Epithelzellen sind in der Lage zu Typ-I-Epithelzellen zu differenzieren und können dadurch *in-vivo* geschädigte Typ-I-Epithelzellen ersetzen. Eine Isolation von Typ-I-Epithelzellen ist aufgrund ihrer Empfindlichkeit nach wie vor sehr problematisch. Bei der Ratte gibt es Ansätze, bei denen Typ-I-Epithelzellen mit einem Antikörper gegen das integrale T1alpha-Membranprotein markiert werden und so von den Typ-II-Epithelzellen getrennt werden können (Chen et al., 2004; Dobbs et al., 1998; Weller and Karnovsky, 1986). Aus humanem Material ist eine solche Isolation noch nicht gelungen. Statt dessen werden für *in-vitro*-Versuche Typ-II-Epithelzellen verwendet, deren Differenzierungsmöglichkeit genutzt wird, um Typ-I-ähnliche Epithelzellen zu gewinnen. Dies ist vor allem bei frisch isolierten primären Epithelzellen möglich. Als Zelllinie des humanen Alveolarepithels stehen A549-Zellen zur Verfügung. Diese Linie wurde aus der Kultur eines Explantats von Karzinomgewebe eines 58-jährigen Mannes entwickelt (Lieber et al., 1976) und wurde in zahlreichen Studien als *in-vitro*-Modell für Typ-II-Epithelzellen

eingesetzt. Diese Studien reichen von Untersuchungen von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Ozon (Cheng et al., 2003b), Inhibition des Ionentransports durch Hyperoxie (Karle et al., 2004), LPS-induzierte molekulare Mechanismen (Fakler et al., 2000), Beeinflussung der zur Bildung von Surfactantproteinen relevanten Transkriptionsfaktoren durch cAMP (Li et al., 1998), Expression von Genen für proinflammatorische Mediatoren nach Virusinfektionen (Kong et al., 2004), Liposomen als Drug-Delivery-Systeme (Abu-Dahab et al., 2001), Methylierung eines Promotors durch Tabakrauch (Anttila et al., 2003), genotoxischen Effekten durch partikuläre Strukturen (Don Porto Carero et al., 2001) bis hin zur Endozytose von uf-Partikeln (Stearns et al., 2001).

## 1.5 Fragestellung/Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, Wirkungsmechanismen, die durch Interaktion ultrafeiner Modellaerosolpartikel mit relevanten Targetzellen des Alveolarraums aktiviert werden, an einem realistischen *in-vitro*-Zellexpositionssystem zu identifizieren. Zellen des Alveolarepithels bilden *in-vivo* eine Barriere zwischen der eingeatmeten Luft und dem Blutkreislauf; zudem deponieren auf ihnen inhalierte luftgetragene Partikel. Daher wird die Reaktion alveolärer Epithelzellen in dieser Studie vorrangig analysiert. Die Arbeitshypothese lautet, dass der durch uf-EC-Partikel erzeugte Stress Veränderungen in der Expression von insbesondere solchen Genen hervorruft, die für oxidative und inflammatorische Prozesse von zentraler Bedeutung sind. Damit wird auch die Frage beantwortet, ob Modellpartikel ohne Kontamination durch Metallionen und mit circa 6 % organischen Verunreinigungen bereits inflammatorische Pathways modulieren.

Um die Probleme der Dosimetrie bei submerser Exposition und bei bisher bekannten Systemen zur Exposition an der LMG zu umgehen, ist für die vorliegende Arbeit ein neues *in-vitro*-Expositionssystem erforderlich. Die Realisierung dieses Konzepts basiert auf einer Apparatur, die (1) die Generierung und online-Charakterisierung eines Kohlenstoff-Modellaerosols ermöglicht und (2) die Exposition von Zellen an der LMG unter kontinuierlicher dosimetrischer Kontrolle zuverlässig gewährleistet. Hierfür werden Zellen auf geeigneten Membranen kultiviert, wobei die Versorgung mit Medium von der basalen Seite und die Exposition mit Partikeln von der apikalen Seite über die Gasphase erfolgt.

Sowohl technische Parameter (einschließlich Luftversorgung, Expositionsdosis und Expositionszeit), als auch die Bedingungen zur Zellkultivierung an der LMG

(Flussgeschwindigkeit des Mediums, Strömungseinflüsse der Gasphase) werden optimiert. Hierbei wird eine Zelllinie verwendet, die sich von Zellen des Alveolarepithels ableitet. Die Wirkung von Aerosolpartikeln auf das simulierte Alveolarepithel wird hinsichtlich oxidativer und entzündlicher Mechanismen auf der transkriptionellen Ebene der Genexpressionen untersucht. Dies geschieht in zwei Phasen. In der ersten Phase wird die Expressions-Array-Technologie angewendet, um durch ein Screening einzelne Kandidaten-Gene zu identifizieren. In der zweiten Phase werden die Array-Daten mittels quantitativer PCR verifiziert und durch Wiederholung von Expositionen bei verschiedenen Dosisbereichen bestätigt.

Zum Vergleich werden neben den Expositionen an der LMG auch Partikelexpositionen an submersen Kulturen durchgeführt, um unterschiedliche Dosisabhängigkeiten der biologischen Antwort zu beschreiben.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Eigenschaften des ultrafeinen EC-Aerosols

Die Expositionen der alveolären Epithelzellen (A549) mit luftgetragenen Partikeln an der LMG wurden mit einem frisch erzeugten Modellaerosol aus Kohlenstoffpartikeln (elemental carbon, EC) durchgeführt. Bei der Generierung von uf-EC-Partikeln mit dem Palas-GFG1000-Generator entstanden 5 - 10 nm große Primärpartikel, die zunächst in hoher Konzentration in Argon als Trägergas vorlagen und stark zur Agglomeration neigten. Je höher der zur Generierung verwendete Argonstrom war, desto kleiner blieben die Partikel.

#### 2.1.1 Verdünnung des Aerosols

Für die Exposition der Zellen an der LMG wurde nur ein geringer Teil des verdünnten Aerosols benötigt. Dieser Anteil wurde mit einer Schlauchpumpe entnommen und mit filtrierter Laborluft weiter verdünnt (zweite Verdünnung). In Abb. 4 ist die Abhängigkeit des resultierenden Aerosolflusses von der Drehzahl der Schlauchpumpe aufgezeigt.

Über die Einstellung der Schlauchpumpe konnte die Partikelkonzentration des Aerosols beeinflusst werden (Abb. 5). Bei hohen Drehzahlen stieg die Konzentration der Partikel deutlich an. Diese Möglichkeit wurde insbesondere dafür genutzt, um Expositionen mit höheren Partikeldosen durchzuführen. Die Partikelkonzentrationen wurden bei Einstellungen der Schlauchpumpe zwischen 20 und 40 SkT vermessen. Für höhere Einstellungen war der Messbereich des CPC nicht ausreichend.

Um die Argon-Konzentration im Aerosol zu verringern, wurde der Fluss aus der Schlauchpumpe, unabhängig von der Einstellung der Schlauchpumpe, mit einem konstanten Luftstrom verdünnt (zweite Verdünnung, s. oben). Dieser bestand aus 7,3 L/min filtrierter Raumluft, die mit 0,5 L CO<sub>2</sub> angereichert war. Für eine Einstellung der Schlauchpumpe von 30 SkT (0,9 L/min) lag somit eine 1:10-Verdünnung des Aerosols vor. Das zur Exposition mit niedrigen Partikelkonzentrationen verfügbare Aerosol bei einer Einstellung der Schlauchpumpe von 30 SkT wurde mit dem Massenspektrometer vermessen. Die

## 2. Ergebnisse

Gaszusammensetzung war für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> in einem für den Alveolarraum relevanten Bereich; das Aerosol enthielt 5,5 % (± 0,1) Kohlendioxid und 16,4 % (± 0,3) Sauerstoff (n = 3). Die restliche Gasphase setzte sich aus 16,8 % (± 0,3) Argon und 61,3 % (± 1,1) Stickstoff zusammen. Da es sich bei Argon um ein Edelgas handelt, wurde dessen leicht erhöht verbleibende Konzentration im Vergleich zur Atemluft nicht als problematisch für die Zellen erachtet. Für jeden Block mit drei Expositionskammern wurden 750 ml Aerosol pro Minute benötigt. Das restliche Aerosol wurde in den Abzug geleitet.

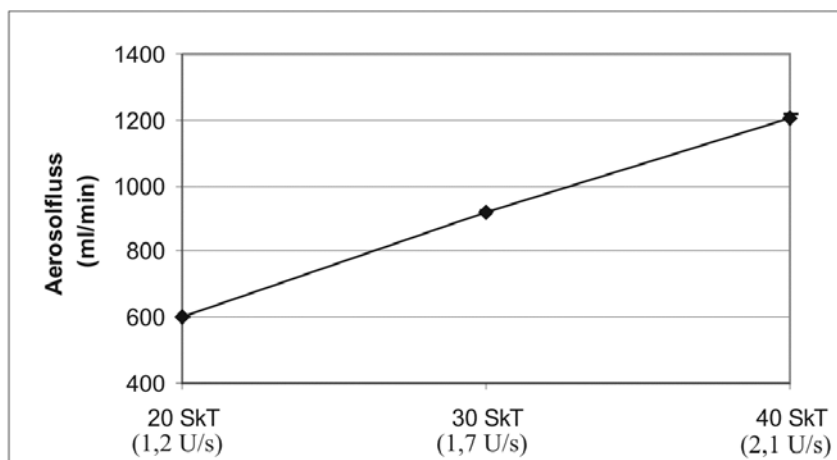


Abb. 4.  
Aerosolfluss in  
Abhängigkeit von der  
Drehzahl der  
Schlauchpumpe zur  
Aerosolverdünnung;  
MW und SD.

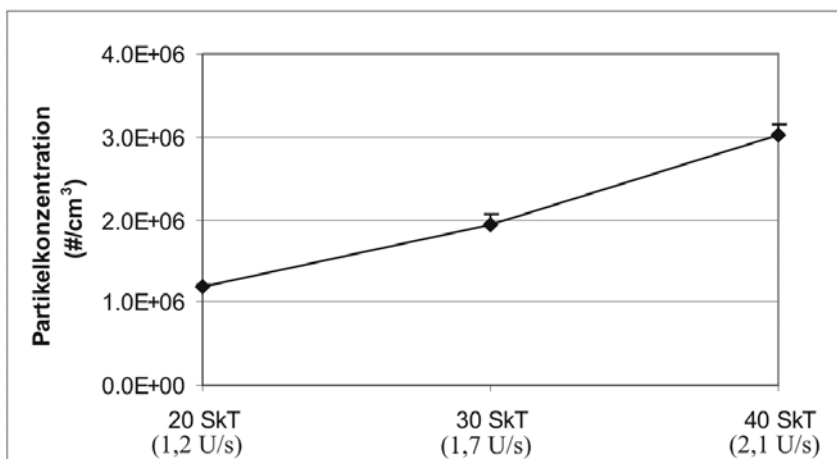


Abb. 5.  
Partikelkonzentration in  
Abhängigkeit von der  
Einstellung der  
Schlauchpumpe zur  
Aerosolverdünnung.  
Aerosol bei 240 Hz  
generiert, Messpunkt 1  
(Abb. 6), RT; MW und SD.

### 2.1.2 Eigenschaften des Aerosols im Expositionssystem nach Befeuchtung

Zur Charakterisierung der Aerosolpartikel an verschiedenen Stellen im Expositionssystem wurde unbefeuchtetes Aerosol mit befeuchtetem Aerosol verglichen. Unbefeuchtetes Aerosol ist am Institut für Inhalationsbiologie bereits bei unterschiedlichen Einstellungen der Funkenfrequenz am Palas-Generators charakterisiert worden



(Roth et al., 2004). Der mediane Durchmesser der Partikelgrößenverteilung (count median diameter, CMD) und die Anzahlkonzentration ( $N_A$ ) der Partikel im unbefeuchteten und befeuchteten Aerosol sind an mehreren Messpunkten in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Partikel an verschiedenen Messpunkten (siehe Abb. 6) bei einer Funkenfrequenz von 60 Hz; MW und SD; n.b. = nicht bestimmt.

	Frequenz (Hz)	Zustand	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4
CMD (nm)	60	unbefeuchtet	65	84	99	140
$\pm$ SD			7.01	3.62	4.59	17.5
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	60	unbefeuchtet	6.97E+06	2.22E+06	1.79E+06	3.79E+05
$\pm$ SD			9.61E+05	6.53E+04	9.43E+04	1.22E+05
CMD (nm)	60	befeuchtet	70	n.b.	112	n.b.
$\pm$ SD			5.18		3.05	
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	60	befeuchtet	6.96E+06	n.b.	2.49E+06	n.b.
$\pm$ SD			8.39E+05		3.30E+05	

Die Messungen zur Aerosolcharakterisierung wurden bei 60 Hz durchgeführt. Mit dieser Funkenfrequenz war es möglich, an allen Stellen im Expositionssystem die Partikelkonzentration ohne eine Verdünnung durch die oben beschriebene zusätzliche Schlauchpumpe zu messen. Erst bei den Expositionsexperimenten, die mit einer Funkenfrequenz von 240 Hz durchgeführt wurden, wurde der Einsatz dieser zusätzlichen Verdünnungsstufe notwendig.

Beim unbefeuchteten Aerosol wurden unmittelbar vor der Expositionsapparatur und der Befeuchtung am Messpunkt 1 (s. Abb. 6), am Messpunkt 2 zwischen der Befeuchtung und der Expositions-kammer, nach dem Austritt aus der Kammer am Messpunkt 3 und nach dem Flowmeter am Messpunkt 4 der Partikeldurchmesser und die Partikelkonzentration gemessen. Nach der Befeuchtung des Aerosols trat eine größerer CMD am Messpunkt 3 im Vergleich zum unbefeuchteten Aerosol auf (Tab. 3). Am Messpunkt 1 lag in beiden Messungen das selbe Aerosol vor, da dieser Messpunkt vor der Befeuchtereinheit lag. Die Konzentration des befeuchteten Aerosols nahm am Messpunkt 3 im Vergleich mit dem Messpunkt 1 um 64 % ab; beim unbefeuchteten Aerosol war die Abnahme mit 74 % der Partikelanzahl etwas stärker. Damit einhergehend nahm der Partikeldurchmesser um 52 % bzw. um 60 % zu.

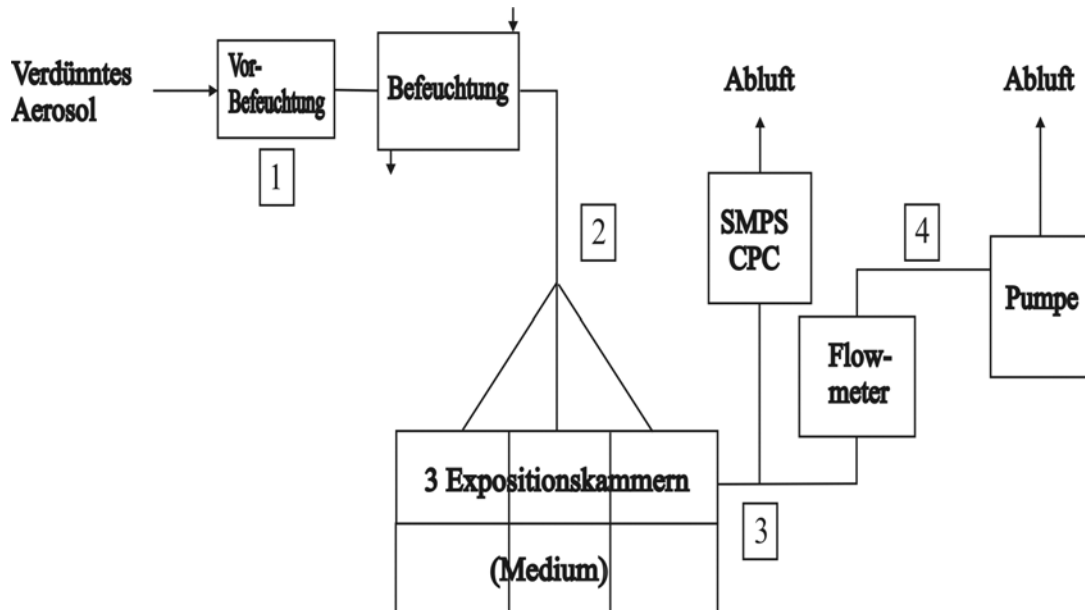


Abb. 6. Messpunkte (1-4) der Partikelkonzentration im Expositionssystem; dargestellt ist die Standardmessung (SMPS und CPC an Messpunkt 3) in den Expositionsexperimenten.

### 2.1.3 Eigenschaften des Aerosol nach Temperierung

Für die Expositionen der A549-Zellen war außer der Befeuchtung des Aerosols auch eine Erwärmung auf 37 °C notwendig, um den Zellen ein den natürlichen physiologischen Bedingungen entsprechendes Umfeld bieten zu können. Partikel, die mit einer Funkenfrequenz von 240 Hz erzeugt wurden, waren ideal für die durchzuführenden Expositionsexperimente. Außer der gewählten Partikelkonzentration lagen am Messpunkt 3 bei der Generierung mit 240 Hz auch höhere Partikelmassenkonzentrationen vor (siehe Kapitel 2.3). Auch ist ein direkter Vergleich mit den uf-EC-Partikeln möglich, die ebenfalls mit einer Funkenfrequenz von 240 Hz generiert und in der Studie für submerse Stimulationen verwendet wurden.

Die Partikelcharakteristika, die nach einer Temperierung des Aerosols auf 37 °C gemessen wurden, entsprachen bei Generierung mit 30 Hz und mit 240 Hz weitgehend denen bei Raumtemperatur. Bei der Messung der medianen Partikeldurchmesser (CMD) und Anzahlkonzentrationen ( $N_A$ ) an verschiedenen Stellen im Expositionssystem (Abb. 6) lieferte der SMPS in Kombination mit dem CPC bei Generierung mit 240 Hz die in Tab. 4 aufgeführten Werte und bei Generierung mit 30 Hz die in Tab. 5 aufgeführten Werte.

Tab. 4. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Partikel an verschiedenen Messpunkten (Abb. 6) bei einer Funkenfrequenz von 240 Hz; T, Temperatur; MW und SD.

	Frequenz (Hz)	Schlauch- Pumpe (SkT)	T	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3
CMD (nm)	240	30	RT	97	98	103
$\pm$ SD				0.56	0.39	1.13
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	240	30	RT	2.34E+06	1.28E+06	1.67E+06
$\pm$ SD				7.26E+04	4.11E+04	3.33E+04
CMD (nm)	240	30	37 °C	91	97	108
$\pm$ SD				0.71	0.46	0.96
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	240	30	37 °C	2.03E+06	1.75E+06	1.27E+06
$\pm$ SD				1.61E+05	1.24E+05	8.82E+04

Mit zunehmender räumlicher Entfernung vom Generator stieg der Partikeldurchmesser leicht an und die Partikelkonzentration fiel ab. Bei Raumtemperatur (RT) wurde am Messpunkt 3 im Vergleich zu Messpunkt 1 eine um 32 % erniedrigte Partikelkonzentration (bei 30 Hz, Tab. 5) und eine um 29 % erniedrigte Partikelkonzentration (bei 240 Hz, Tab. 4) gemessen. Bei 37 °C lagen am Messpunkt 3 im Vergleich zum Messpunkt 1 50 % weniger Partikel (bei 30 Hz) bzw. 37 % weniger Partikel (bei 240 Hz) vor.

Tab. 5. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Partikel an verschiedenen Messpunkten (Abb. 6) bei einer Funkenfrequenz von 30 Hz; MW und SD; T ist die Temperatur; n.b., nicht bestimmt.

	Frequenz (Hz)	Schlauch- Pumpe (SkT)	T	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4
CMD (nm)	30	40	RT	46	48	51	55
$\pm$ SD				0.58	0.40	0.69	0.30
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	30	40	RT	2.12E+06	1.65E+06	1.45E+06	1.18E+06
$\pm$ SD				1.00E+05	3.20E+04	6.86E+04	2.64E+04
CMD (nm)	30	40	37 °C	42	44	46	n.b.
$\pm$ SD				0.24	0.17	0.14	
$N_A$ (#/cm <sup>3</sup> )	30	40	37 °C	1.61E+06	9.90E+05	8.07E+05	n.b.
$\pm$ SD				6.85E+04	2.92E+04	2.61E+04	

Allgemein sollte am Messpunkt 1 bei beiden Temperaturen dasselbe Aerosol vorliegen, da die Temperierung erst an einer späteren Stelle im Expositionssystem erfolgte. Die bei Generierung mit 30 Hz bei 37 °C an Messpunkt 1 um 24 % erniedrigte Partikelkonzentration im Vergleich zur Messung bei RT zeigen Schwankungen des sensiblen Systems. Bei der Generierung mit 240 Hz war am Messpunkt 1 bei 37 °C im Vergleich zur RT die Partikelkonzentration um 13 % erniedrigt und somit das System unter diesen Bedingungen, wie sie auch in den Kammerexperimenten vorliegen, stabiler.

## 2.2 Partikelkonzentrationen im gefilterten Aerosol

Die Bedingungen in der Kontrollkammer und in der Kammer für die Aerosol-Exposition sollten möglichst identisch sein. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Aerosolpartikel in der Kontrollstrecke mit einem strahlensterilisierten PALL-Filter weitgehend entfernt wurden. Tab. 6 zeigt die nach den Expositionskammern gemessene Anzahl- und Massenkonzentration des Aerosols in beiden Strecken.

Tab. 6. Anzahl- und Massenkonzentration (Dichte = 1 g/cm<sup>3</sup>) des Aerosols in der EC- und Kontrollstrecke am Messpunkt 3 (siehe Abb. 6) bei eingeschaltetem (240 Hz) und ausgeschaltetem Funkengenerator (0 Hz); der Kontrollstrecke ist ein PALL-Filter vorgeschaltet; MW und SD.

Strecke	Frequenz (Hz)	Anzahl (Partikel pro cm <sup>3</sup> )	± SD	Masse (µg/m <sup>3</sup> )	± SD
Kontrolle	240	29,11	47,55	3,09	6,03
Kontrolle	0	13,68	11,24	0,66	0,94
EC	240	1,93E+06	1,37E+05	2131,66	209,99
EC	0	64,11	38,8	0,64	0,77

Die Partikelanzahlkonzentration im filtrierten Kontrollaerosol im Vergleich zum EC-Aerosol bei 240 Hz betrug 0,002 %; die Massenkonzentration 0,145 %. Bei abgeschalteter Partikelproduktion am Generator waren geringe Restmassen in der „Expositionsatmosphäre“ vorhanden, die in der Kontrollstrecke und in der EC-Strecke nahezu gleich waren. Es ist

anzunehmen, dass diese kleinen Restmassen nicht aus dem Generator stammten, da die Filtrierung keinen Unterschied bewirkte. Vermutlich handelte es sich um Partikel, die sich aus der Befeuchtung (mit isotonischer Kochsalzlösung) gelöst hatten. Die Anzahlkonzentration war ohne Partikelproduktion in der EC-Strecke um den Faktor 4,7 höher als bei der Kontrollstrecke. Im Vergleich zum generierten Aerosol bei 240 Hz waren die Konzentrationen und Restmassen an Partikeln mit ausgeschalteter Funkenfrequenz (Frequenz = 0 Hz) jedoch vernachlässigbar.

### 2.3 Aerosol der Luft-Medium-Grenzschicht-Expositionen

Für die Berechnung der deponierten Partikel war es notwendig, die verwendete Partikelkonzentration in jedem Versuch über die ganze Expositionszeit zu kennen. Bei jeder Exposition an der LMG wurde daher das Aerosolprofil aufgezeichnet. Die Konzentration der Partikel war in einem Bereich von 1,2 bis  $3,2 \times 10^6$  Partikel/cm<sup>3</sup> durch eine entsprechende Verdünnung einstellbar. Der CMD der Partikel lag zwischen 83 nm und 122 nm. Bei der Generierung mit 240 Hz konnten höhere Partikelmassen erreicht werden als bei der Generierung von kleineren Partikeln mit niedrigeren Funkenfrequenzen. Bei dem für die Kammerexpositionen verwendeten Aerosol lagen Massenkonzentrationen zwischen 550 und 3830 µg/m<sup>3</sup> vor. Der mediane Massendurchmesser (mass median diameter, MMD) lag zwischen 140 nm und 220 nm. Die durchgeführten Kammerexperimente wurden nach den folgenden drei Dosisintervallen unterteilt: LOW-DOSE-, MID-DOSE- und HIGH-DOSE-Expositionen.

Tab. 7. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Aerosolpartikel nach der Anzahl bzw. Durchmesser (MMD) und Konzentration ( $N_M$ ) nach der Masse abgeleitet; LOW-DOSE-Expositionen, bei 240 Hz generiert und Schlauchpumpe zur Verdünnung bei durchschnittlich 33 SkT; KV, Kammerversuch; MW und SD.

LOW-DOSE- Expositionen	CMD ± SD (nm)	$N_A$ (Partikel/cm <sup>3</sup> )	± SD	MMD ± SD (nm)	$N_M$ (µg/m <sup>3</sup> )	± SD
28KV	89 4	1.36E+06	1.44E+05	148 5	656	138
29KV	90 4	1.23E+06	8.38E+04	156 8	656	99
30KV	86 3	1.20E+06	8.62E+04	148 8	555	84
31KV	91 2	1.19E+06	9.81E+04	156 6	644	106
38KV	83 4	1.36E+06	3.15E+05	140 5	553	195

## 2. Ergebnisse

Bei den LOW-DOSE-Expositionen wurden in den einzelnen Experimenten Partikelanzahlkonzentrationen von 1,2 bis  $1,4 \times 10^6$  Partikel/cm<sup>3</sup> gemessen. Der mittlere CMD lag zwischen 83 und 91 nm (Tab. 7). Pro Kubikmeter war im Mittel 613 µg partikuläres Material vorhanden. Der MMD, der stark von der Masse einer sehr geringen Anzahl größerer Partikel beeinflusst war, lag höher als der mediane Durchmesser der Partikelgrößenverteilung. Bei allen Betrachtungen in diesem Kapitel wurde eine Dichte der Partikel von 0,6 g/cm<sup>3</sup> angenommen.

Für die MID-DOSE-Expositionen variierten die Partikelkonzentrationen einzelner Experimente zwischen  $1,5$  und  $2,1 \times 10^6$  Partikel/cm<sup>3</sup>; die Partikel waren gemittelt zwischen 83 und 107 nm groß. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller acht MID-DOSE-Expositionen sind in der Tab. 8 aufgeführt. Die mittlere Massenkonzentration betrug 1344 µg/m<sup>3</sup>.

Tab. 8. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Aerosolpartikel nach der Anzahl bzw. Durchmesser (MMD) und Konzentration ( $N_M$ ) nach der Masse abgeleitet; MID-DOSE-Expositionen, bei 240 Hz generiert und Schlauchpumpe zur Verdünnung bei durchschnittlich 34 SkT; KV, Kammerversuch; MW und SD.

MID-DOSE-Expositionen	CMD ± SD (nm)	$N_A$ (Partikel/cm <sup>3</sup> )	± SD	MMD ± SD (nm)	$N_M$ (µg/m <sup>3</sup> )	± SD
19KV	101 5	1.48E+06	1.33E+05	185 12	1259	296
20KV	102 4	1.95E+06	2.16E+05	214 35	1962	617
23KV	107 4	1.88E+06	1.16E+05	175 6	1559	212
24KV	107 3	1.93E+06	1.83E+05	175 4	1580	247
25KV	97 3	1.52E+06	1.15E+05	161 4	945	129
26KV	100 4	1.89E+06	2.11E+05	166 5	1292	236
27KV	99 4	2.12E+06	1.87E+05	165 5	1428	227
37KV	83 3	1.80E+06	2.87E+05	140 4	725	159

Das Intervall mit der höchsten verwendeten Dosis umfasste die HIGH-DOSE-Expositionen. Die Partikelanzahlkonzentrationen lagen bei diesen Versuchen zwischen  $2,5$  und  $3,2 \times 10^6$  Partikel/cm<sup>3</sup> (Tab. 9). Der 36. Kammerversuch wurde nach der hierzu passenden Anzahlkonzentration in diese Gruppe geordnet. Da die Partikel in diesem Experiment kleiner waren als bei den drei anderen HIGH-DOSE-Experimenten, wurde beim 36KV auch eine kleinere Massenkonzentration gemessen. Im Mittel betrug die Massenkonzentration 3214 µg/m<sup>3</sup>.

Tab. 9. Durchmesser (CMD) und Konzentration ( $N_A$ ) der Aerosolpartikel nach der Anzahl bzw. Durchmesser (MMD) und Konzentration ( $N_M$ ) nach der Masse abgeleitet; HIGH-DOSE-Expositionen, bei 240 Hz generiert und Schlauchpumpe zur Verdünnung bei durchschnittlich 90 SkT; KV, Kammerversuch; MW und SD.

HIGH-DOSE-Expositionen	CMD $\pm$ SD (nm)	$N_A$ (Partikel/cm <sup>3</sup> )	$\pm$ SD	MMD $\pm$ SD (nm)	$N_M$ ( $\mu$ g/m <sup>3</sup> )	$\pm$ SD
32KV	114 8	3.20E+06	4.01E+05	209 12	3825	952
33KV	115 10	3.20E+06	7.30E+05	206 17	3832	1312
34KV	122 11	2.52E+06	7.03E+05	221 23	3418	637
36KV	93 5	3.00E+06	3.97E+05	162 9	1779	350

Die in Tab. 7 bis Tab. 9 dargestellten Durchmesser, Anzahl- und Massenkonzentrationen beziehen sich auf das verwendete Aerosol. Im Expositionssystem deponierten aus diesem Aerosol 2 % der Partikel auf den Zellen, die auf den Anodisk-Membranen an der LMG positioniert waren. Bei einem Aerosolfluss von 250 ml/min und einer Expositionsdauer von 6 h wurden demnach Partikel aus insgesamt 1,8 L Aerosol deponiert. Bei einer Gesamtfläche der Anodisk-Membran von 12,57 cm<sup>2</sup> konnte die Anzahl und Masse der deponierten Partikel pro cm<sup>2</sup> berechnet werden. Die Kennzahlen für die drei Dosisintervalle sind in Tab. 10 wiedergegeben.

Tab. 10. Konzentration ( $N_A$ ), Masse ( $N_M$ ) und Durchmesser (CMD) der in 6 Stunden auf den Anodisk-Membranen deponierten Partikel in Abhängigkeit vom Dosisintervall; MW und SD.

Dosisintervall	$N_A$ (Partikel/cm <sup>2</sup> )	$\pm$ SD	$N_M$ (ng/cm <sup>2</sup> )	$\pm$ SD	CMD (nm)	$\pm$ SD
LOW-DOSE	1,85E+08	$\pm$ 1,25E+07	90	$\pm$ 8	88	$\pm$ 3
MID-DOSE	2,66E+08	$\pm$ 3,19E+07	196	$\pm$ 56	100	$\pm$ 7
HIGH-DOSE	4,35E+08	$\pm$ 4,69E+07	470	$\pm$ 143	111	$\pm$ 13

In Tab. 10 werden die Konzentrations- und Größenunterschiede zwischen den Dosisintervallen aufgezeigt. Die Partikelkonzentration ( $N_A$ ) bei MID-DOSE lag um 44 % über der von LOW-DOSE, während die Partikelkonzentration bei HIGH-DOSE um 64 % über der von MID-DOSE lag. Bei der Massenkonzentration ( $N_M$ ) lag ein 118 %iger Anstieg von der LOW-DOSE zur MID-DOSE und ein 140 %iger Anstieg von der MID-DOSE zur HIGH-DOSE vor. Auch der CMD der Partikel stieg mit höheren Konzentrationen an.

## 2. Ergebnisse

---

Zur Charakterisierung der Verteilung der Partikelanzahlkonzentration für die in den Kammerexperimenten verwendeten Aerosole wurden neben dem Durchmesser (CMD) und der Anzahlkonzentration ( $N_A$ ) auch die geometrische Standardabweichung ( $\sigma_g$ ) verwendet, um die Breite der Verteilungskurve zu definieren. Monodisperse Aerosole weisen eine geometrische Standardabweichung unter 1,15 auf. Mit  $\sigma_g$ -Werten zwischen 1,53 und 1,58 bei der Anzahlkonzentration waren die verwendeten Aerosole polydispers, d.h. sie setzten sich aus Partikeln unterschiedlicher Größe zusammen.

In Abb. 7 ist das Partikelkonzentrationspektrum eines exemplarischen Kammerversuchs gezeigt (30KV). Für jeden Durchmesser wurden die Werte der alle 5 min durchgeführten Konzentrationsmessungen gemittelt.

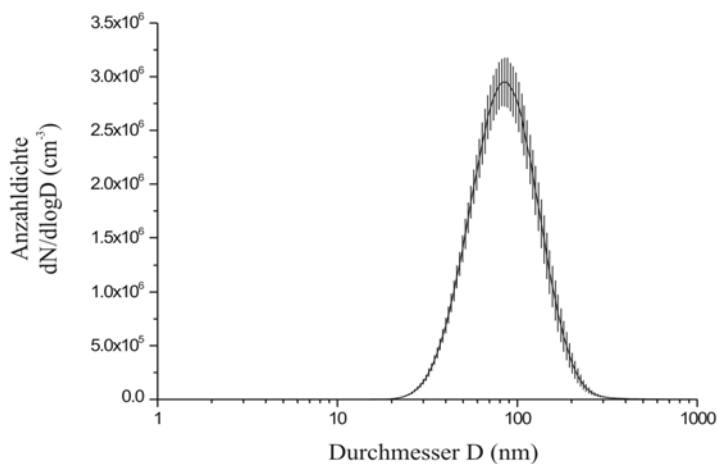


Abb. 7.  
Partikelanzahlverteilung eines typischen Aerosols einer LOW-DOSE-Exposition. Aufgetragen ist der Durchmesser (log) gegen die Konzentration (linear); MW und SD;  $\sigma_g$ , 1,54.

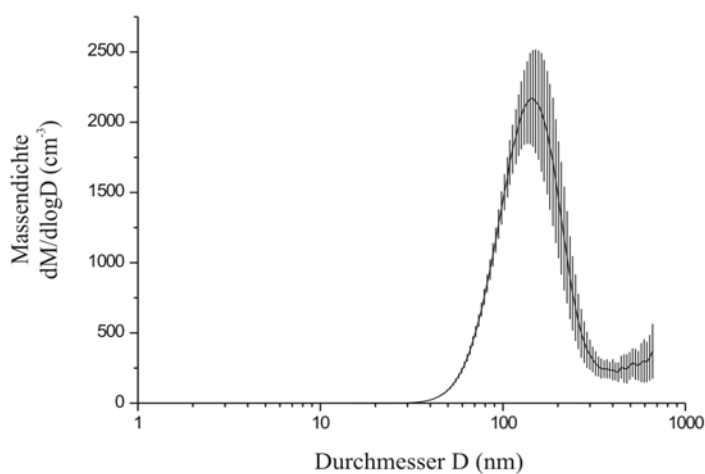


Abb. 8.  
Partikelmassenverteilung eines typischen Aerosols einer LOW-DOSE-Exposition. Aufgetragen ist der Durchmesser (log) gegen die Masse (linear); MW und SD;  $\sigma_g$ , 1,66.



Bei der Betrachtung der Massenverteilung (Abb. 8), ist das Spektrum in Vergleich zum Konzentrationsspektrum (Abb. 7) zu höheren Partikelgrößen hin verschoben. Auffällig ist der „Schwanz“ in Abb. 8, der oberhalb von 300 nm auftritt. Die vereinzelt Partikel dieser Größenordnung sind im Anzahlkonzentrationspektrum (Abb. 7) nicht zu sehen. Bei der Darstellung der Masse in Abhängigkeit von der Größe ist beispielsweise bei den 600 nm Partikeln eine Masse von  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$  vorhanden. Die Massenkonzentration in diesem Bereich geht nicht auf 0 zurück.

Um eine Aussage über die Gleichförmigkeit des Aerosols über die 6-stündige Expositionsdauer zu erhalten, wurden der mediane Durchmesser (CMD) und die Anzahlkonzentration ( $N_A$ ) der einzelnen Kammerexperimente über die Zeit ausgewertet. Aus Abb. 9 geht hervor, dass der Durchmesser der Partikel während der Expositionsdauer um circa 10 nm anstieg. Die Anzahlkonzentration schwankte innerhalb eines 15 % Intervalls um den Mittelwert, der bei dieser LOW-DOSE-Exposition bei  $1,2 \times 10^6$  Partikel/ $\text{cm}^3$  lag.

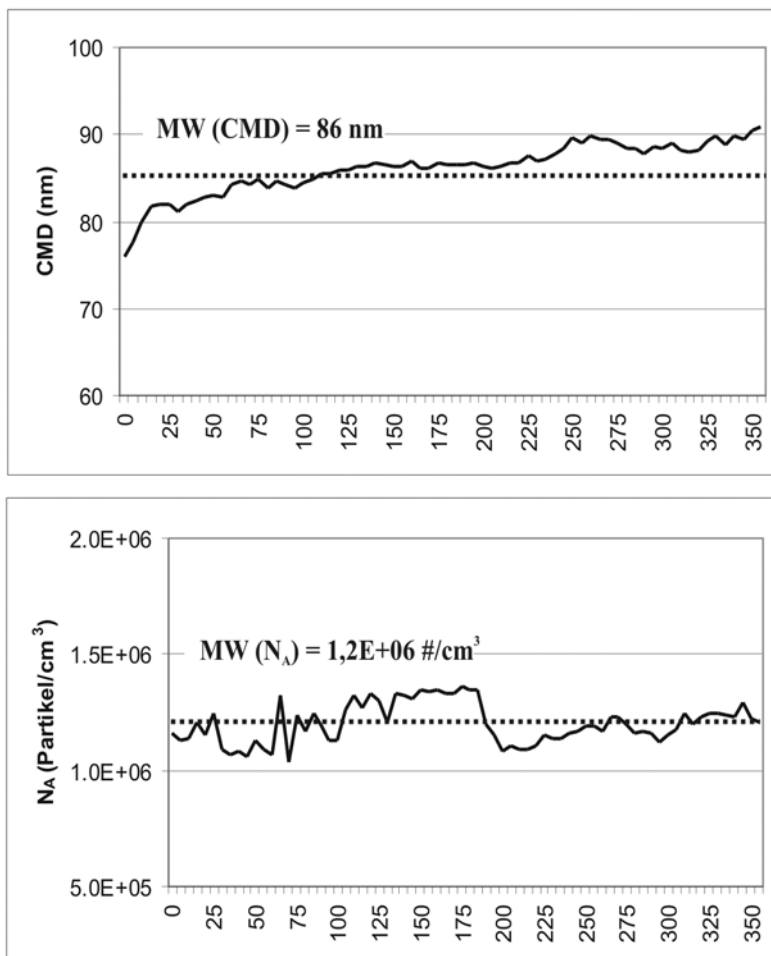


Abb. 9.  
Durchmesser (CMD, oben)  
und Anzahlkonzentration  
( $N_A$ , unten) eines typischen  
Aerosols einer LOW-DOSE-  
Exposition;  
auf der x-Achse ist die  
Expositionsdauer in Minuten  
aufgetragen.

## 2.4 Aerosolverunreinigungen

Auf dem LB-Medium waren nach zehn Tagen durchschnittlich  $0,5 (\pm 0,9; n = 14)$  Kolonien gewachsen. Das bedeutet, dass in 18 L des verdünnten Aerosols durchschnittlich ein Bakterium vorhanden war. Bei einer Exposition mit 250 ml/min ist die Wahrscheinlichkeit der Kontamination sehr gering. Des weiteren sorgte die Prallplatte in der Verteilereinheit der Expositions-kammer dafür, dass große partikuläre Aerosolbestandteile und auch eventuell vorhandene Bakterien an dieser Stelle aus dem Aerosol entfernt wurden.

## 2.5 Temperatur

Bei submersen Expositionen im Inkubator ist eine konstante Temperatur von  $37\text{ °C}$  leicht zu erreichen, während bei den Kammerexperimenten an der LMG die Stabilisierung der Temperatur problematisch ist.

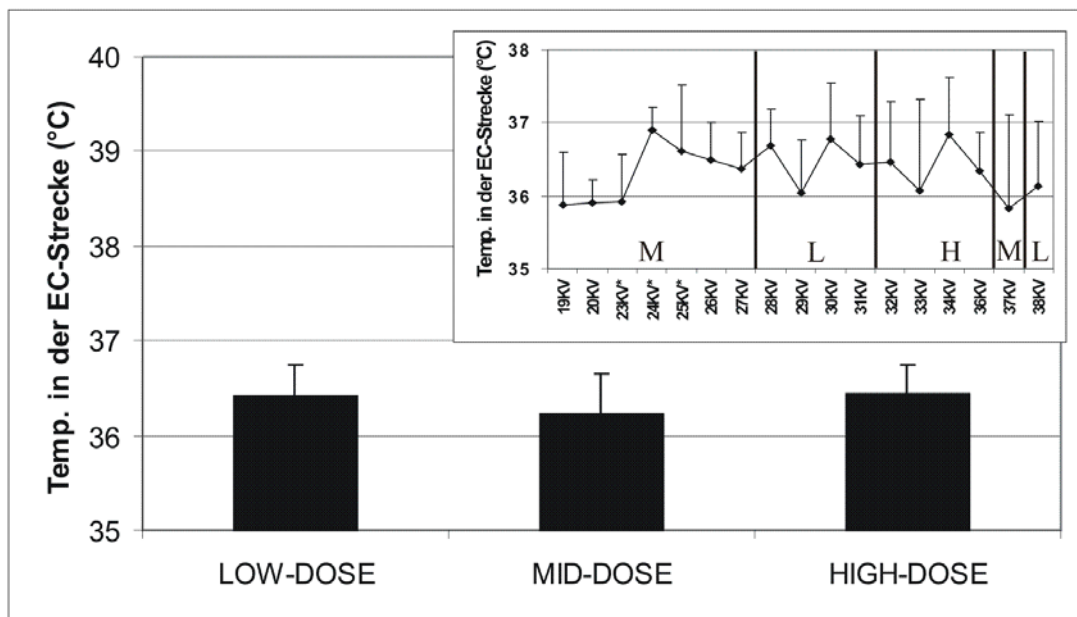


Abb. 10. Mittlere Temperaturen des Aerosols in der EC-Strecke für die Dosisintervalle; MW und SD. Im Insert sind die mittleren Temperaturen in der EC-Strecke für die Einzelversuche dargestellt; KV, Kammerversuch; MW und SD. \* für 23KV, 24KV und 25KV (MID-DOSE-Expositionen) wurde die Temperatur in der Kontrollstrecke gemessen, da der EC-Messfühler ausgefallen war. Im Insert bedeuten: L, LOW-DOSE-Expositionen; M, MID-DOSE-Expositionen; H, HIGH-DOSE-Expositionen.

Abb. 10 zeigt die Temperaturen die bei den Expositionsexperimenten gemessen wurden. Im Mittel waren zwischen LOW-, MID- und HIGH-DOSE-Expositionen kaum Unterschiede zu sehen. Die mittleren Temperaturen in der EC-Strecke der einzelnen Kammerexperimente lagen zwischen 35,8 °C und 36,9 °C.

## 2.6 Integrität der Monolagen an A549-Zellen auf Anodisk-Membranen

### 2.6.1 Optische Integrität

Eine wichtige Voraussetzung für eine zuverlässige Dosimetrie ist die Bildung einer konfluenten Monolage an A549-Zellen. Wenn der Zellrasen auf der Membran nicht dicht ist, liegen zellfreie Areale vor, auf denen ebenfalls uf-EC-Partikel deponieren, die jedoch nicht mit den Zellen interagieren. Bei der Bildung eines mehrlagigen Zellrasens haben dagegen nicht alle Zellen die Möglichkeit, mit den Partikeln in Berührung zu kommen. Diese Zellen würden das Ergebnis einer Antwort auf uf-Partikel verfälschen. Aus diesem Grunde wurden nach vier und zehn Tagen Kultivierung der Zellen die Zytoskelettproteine Actin und  $\beta$ -Tubulin markiert und unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet (Abb. 11).

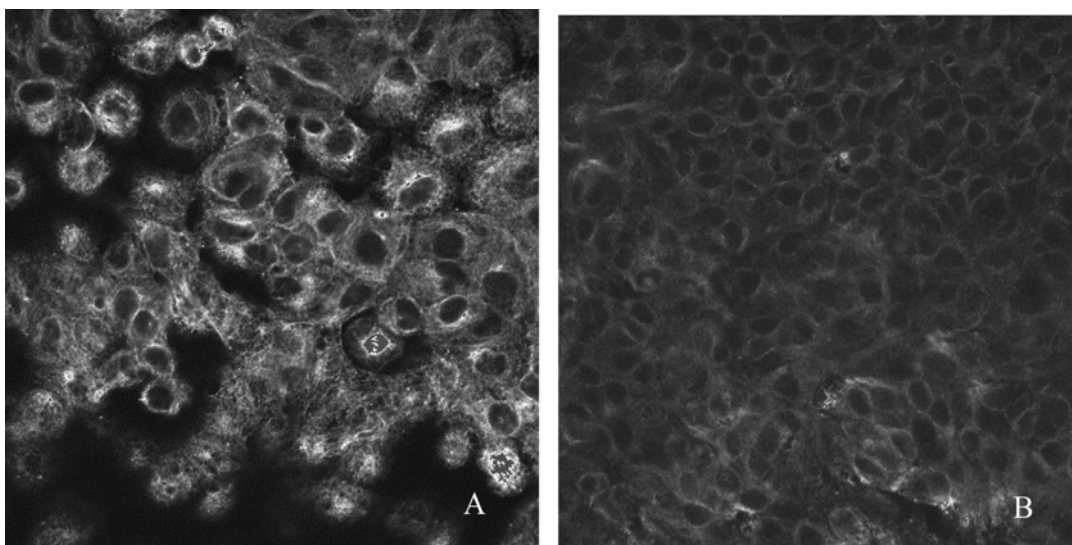


Abb. 11. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (630-fache Vergrößerung) von A549-Zellen auf Anodisk-Membranen: A) nach vier Tagen; B) nach zehn Tagen.

Abb. 11 A zeigt eine Zellschicht nach vier Tagen Wachstum. Es sind noch zellfreie Stellen zu erkennen, wobei insbesondere die Randbereiche kritisch sind. Abb. 11 B zeigt die Fluoreszenz der Actin- und  $\beta$ -Tubulinmarkierung nach zehn Tagen Zellwachstum. Auch nach Kultivierung auf der Anodisk-Membran für diesen Zeitraum sind vereinzelt noch kleine zellfreie Flächen zu erkennen (rechts unten). Eine optische Integrität konnte folglich nicht erreicht werden. Im z-Scan, der eine dreidimensionale Ansicht der Zellen erlaubt, wurden einzelne optische Schnitte der Zellschicht zusammengefügt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Zellen in einer Monolage wachsen.

Vor jedem Kammerexperiment wurden die Anodisk-Membranen unter dem Lichtmikroskop auf zellfreie Stellen untersucht. Hierbei wurden vor allem auf die Randregionen geachtet. Membranen, die bei 100-facher Vergrößerung sichtbare zellfreie Stellen oder Risse aufwiesen, wurden aussortiert und als submerse Kontrollen verwendet.

### **2.6.2 Funktionelle Integrität**

Es war zu keinem Zeitpunkt des Wachstums möglich, einen über dem Leerwert des Filters liegenden spezifischen transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER, siehe Kapitel 5.8) zu messen. Der Leerwert bei dieser Versuchsanordnung ist stark vom Abstand der oberen Elektrode zum Filter und der verwendeten Flüssigkeitsmenge im apikalen Kompartiment abhängig und beträgt für Anodisk-Membranen ohne Zellen 10 bis 35  $\Omega\text{cm}^2$ . Eine funktionelle Integrität konnte mit A549-Zellen auf Anodisk-Membranen nicht erreicht werden.

### **2.6.3 Adhäsive Interaktionen von Zellen**

Adhäsive Interaktionen von Zellen sind essentiell für das Überleben, die Proliferation (Zellteilung), Differenzierung und Funktion von Zellen, aber auch für die zelluläre Kommunikation, wie sie bei zahlreichen physiologischen Prozessen eines vielzelligen Organismus stattfindet. Zellverbindungen durch Tight-Junctions bilden darüber hinaus eine Permeabilitätsbarriere, wahrscheinlich über eine Verhinderung der parazellulären Diffusion von größeren Molekülen. Tight-Junctions trennen die apikale und die basolaterale Membran voneinander.

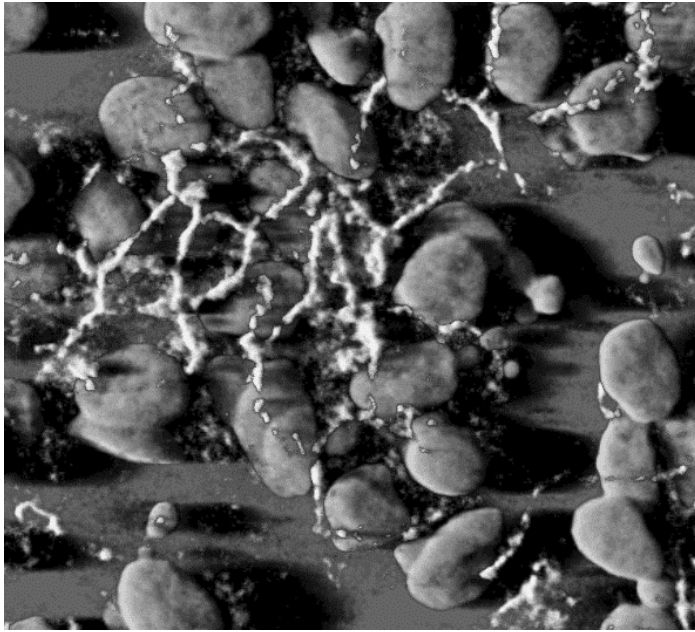


Abb. 12.  
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie,  
Schattenprojektion nach Occludin-  
Markierung von A549-Zellen auf Anodisk-  
Membran. Das Occludin ist weiß, die  
Zellkerne sind grau. Entstanden in  
Kooperation mit Dr. B. Rothen-Rutishauser,  
Anatomisches Institut der Universität Bern.

Ein wichtiges transmembranales Protein der Tight-Junctions ist das Occludin. Es wurde in A549-Zellen, die auf Anodisk-Membranen kultiviert worden waren, angefärbt. In Abb. 12 ist die Occludin-Färbung an einer neuntägigen A549-Membrankultur auf Anodisk-Membranen dargestellt. Auch bei diesen Färbungen zeigte sich, dass geringe Teile der Membran nicht von Zellen bewachsen waren; an vereinzelt Stellen fand eine Überwucherung der Monolage statt.

## **2.7 Viabilität von A549-Zellen nach Kultivierung und Exposition an der Luft-Medium-Grenzschicht**

Normalerweise wachsen A549-Epithelzellen unter submersen Bedingungen nach Anhaften am Boden der Kulturgefäße. Zur Vorbereitung der Exposition an der LMG wurden die Zellen auf einer semipermeablen Membran ausgesät und zunächst neun Tage unter submersen Bedingungen kultiviert. Danach wurden sie in die Expositions-kammern eingesetzt und für 6 h entweder mit der Kontrollatmosphäre (Kontrolle-LMG) oder mit dem Aerosol (EC-LMG) exponiert. Die Zellen versorgten sich in den Expositions-kammern von der basalen Seite durch die poröse Membran hindurch mit Nährstoffen.

### 2.7.1 Trypanblau-Assay

Um die Beeinflussung der Viabilität durch die veränderten Expositionsbedingungen zu untersuchen, wurden der Trypanblau- und der WST1-Assay durchgeführt. Der Trypanblau-Assay erlaubt eine Aussage über die Integrität der Zellmembranen (siehe Kapitel 5.11.1). Bei submerser Inkubation im Brutschrank und anschließender Aufarbeitung für den Trypanblau-Test wiesen 69 % ( $\pm 5$ ) der Zellen für den Farbstoff undurchlässige intakte Membranen auf. Diese Zellzahl entspricht einer Viabilität von 100 % in Abb. 13. Die Viabilität nahm in den Expositions-kammern sowohl bei der Kontrolle an der LMG als auch bei EC-Exposition leicht ab. Für die mit EC-Partikeln exponierten Zellen war diese Abnahme im Vergleich mit der Viabilität von submersen Zellen signifikant.

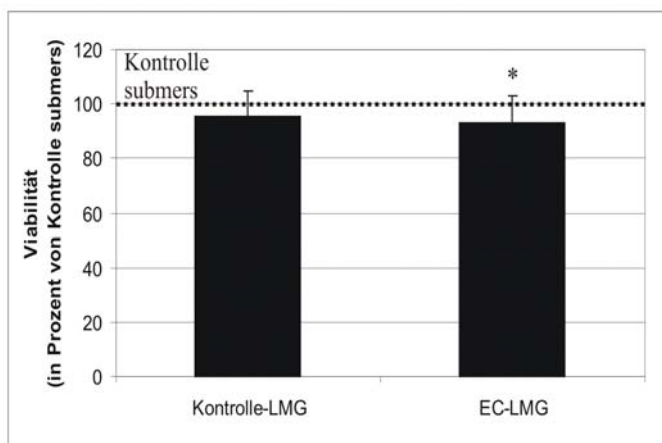


Abb. 13. Viabilitätsbestimmung durch Trypanblau-Assay mit A549-Zellen nach 6 h Kammerversuch (n = 17). Die Viabilität der submersen Kontrollzellen ist auf 100 % gesetzt; MW und SD; \*  $p \leq 0,05$  (versus Kontrolle submers).

### 2.7.2 WST1-Assay

Sind A549-Zellen in ihrer Viabilität beeinträchtigt, zeigte sich dies in einer reduzierten oder fehlenden mitochondrialen Aktivität. Im WST1-Assay wurde die mitochondrielle Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes anhand der Absorptionsänderung im Photometer gemessen. Der veränderte Farbstoff wurde durch eine erhöhte Absorption bei 450 nm detektiert. Die Differenz der Absorptionen bei 450 nm und bei 630 nm steigt in Abb. 14 im zeitlichen Verlauf an. Die Kurve für submers gewachsene Zellen (Kontrolle submers) liegt über den Kurven der Zellen, die an der LMG mit einem Kontrollaerosol (Kontrolle-LMG) oder dem EC-Aerosol (EC-LMG) exponiert worden waren. Die Kurven der Zellen an der LMG (mit und ohne Partikelexposition) liegen eng beieinander.

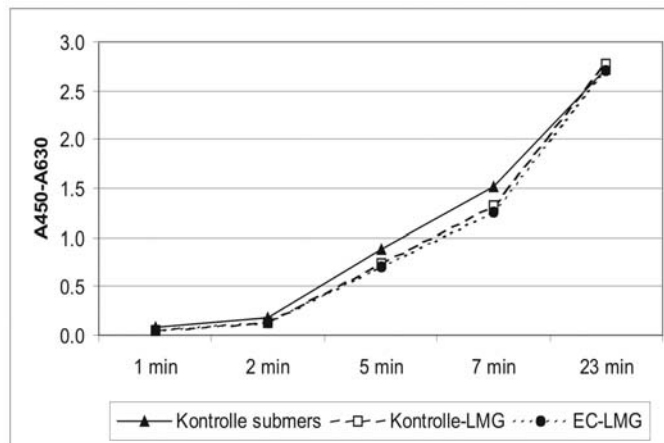


Abb. 14.  
Viabilitätsbestimmung durch WST1-Assay mit A549-Zellen nach 6 h Kammerversuch (repräsentative Messung der Viabilität bei einem Experiment). Die Absorption ( $A_{450}-A_{630}$ ) wurde an 5 Zeitpunkten gemessen.

Hinsichtlich der Viabilität dienten submers kultivierte Zellen als Bezugsgröße. Mit ihnen wurden die Zellen aus den Kammern nach 6 h an der LMG, mit und ohne Partikelexposition, verglichen (Abb. 15). Die Viabilität der submersen Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die prozentuale Viabilität von Kontrolle-LMG und EC-LMG für die einzelnen Messpunkte nach 1, 2, 5, 7 und 23 min errechnet. Um Pipettierfehler auszugleichen, wurden für die einzelnen Experimente Mittelwerte aus der Viabilität bei 5, 7 und 23 min errechnet. Die Viabilität nach 1 und 2 min wurde nicht berücksichtigt. Die Zellen aus der Expositionskammer zeigten eine signifikant erniedrigte Viabilität (Abb. 15). Diese Reduktion blieb im Mittel unter 10 %. Ein statistischer Vergleich zwischen A549-Zellen der Kontrolle-LMG- und EC-LMG-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied.

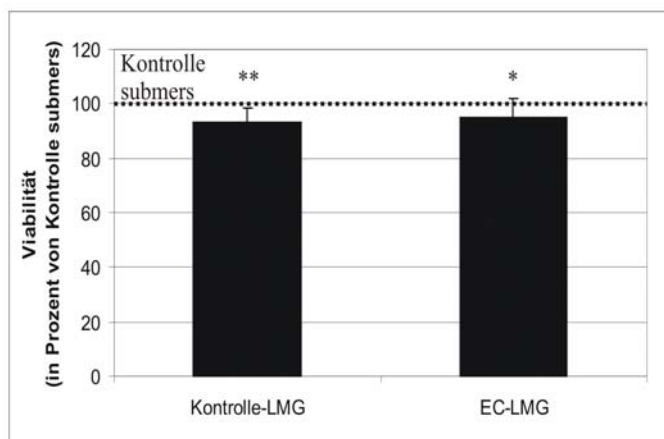


Abb. 15.  
Viabilitätsbestimmung durch WST1-Assay an A549-Zellen nach 6 h Kammerversuch ( $n = 11$ ). Die Viabilität der submersen Kontrollzellen ist auf 100 % gesetzt; MW und SD; \*  $p \leq 0,05$  (versus Kontrolle submers); \*\*  $p \leq 0,01$  (versus Kontrolle submers).

## 2.8 Clontech-Atlas-Array

Der Clontech-Atlas-Array-Human-1.2 wurde - wie im Methodenteil beschrieben – mit der m-RNA einer einzigen MID-DOSE-Exposition durchgeführt. Bei der 6-stündigen Exposition an der LMG wurden im Mittel  $2,9 \times 10^8$  Partikel/cm<sup>2</sup> mit einer mittleren Masse von 287 ng/cm<sup>2</sup> (Dichte = 0,6) auf den Zellen deponiert. In diesem Kapitel sind Autoradiogramme der Hybridisierungen von mit 32P markierten c-DNA-Proben auf Nylonmembranen dargestellt. Sie bildeten die Basis zur Identifizierung von veränderten Genexpressionen, vermittelt durch EC-Partikel alleine (EC) und in Kombination mit dem proinflammatorischen Stimulus TNF (EC + TNF). Die wichtigsten Ergebnisse wurden anschließend mittels LC-PCR überprüft.

Nach dem Einscannen der Autoradiogramme erfolgte die Auswertung mit dem Atlas-Image-Programm. Das Signal wurde korrigiert, indem das Hintergrundrauschen der jeweiligen Membran abgezogen wurde.

Tab. 11. Darstellung der Expressionsunterschiede an einem exemplarischen Gen; Signal 1 = Kontrollmembran; Signal 2 = TNF-Membran.

Signal	Rauschen	Signal	Signal	Rauschen	Signal	Differenz	Name des Gens
1	1	1	2	2	2		
Unkorr.		Korr.	Unkorr.		Korr.		
13196	4096	9100	22224	3584	18640	9540	E16 amino acid transporter

Im Beispiel der Tab. 11 ist Signal 2<sub>korr</sub> größer als Signal 1<sub>korr</sub>; daher gilt Formel 1 zur Berechnung des Expressionsunterschieds, wobei Signal 1<sub>korr</sub> das Signal der Kontrollmembran ist. Durch Stimulation mit TNF wurde die Expression um  $(18640-9100) / 9100 \times 100$ , also um 105 % erhöht.

$$\text{Differenz (\%)} = (\text{Signal } 2_{\text{korr}} - \text{Signal } 1_{\text{korr}}) / \text{Signal } 1_{\text{korr}} \times 100$$

Formel 1

Formel 1 gilt für Gene bei denen Signal 2<sub>korr</sub> größer ist als Signal 1<sub>korr</sub>.



$$\text{Differenz (\%)} = -[(\text{Signal } 1_{\text{korr}} - \text{Signal } 2_{\text{korr}}) / \text{Signal } 1_{\text{korr}} \times 100] \quad \text{Formel 2}$$

Formel 2 gilt für Gene bei denen  $\text{Signal } 2_{\text{korr}}$  kleiner ist als  $\text{Signal } 1_{\text{korr}}$ .

Die weitere Auswertung der Genexpressionsmuster erforderte den Bezug auf Gene, deren Expression sich durch die Stimulation der Zellen nicht verändert hatten. Solche Gene nennt man Housekeeping-Gene. Der Wert für die Schwärzung der Targetgene wurde auf die unterschiedliche Schwärzung der Housekeeping-Gene auf den zu vergleichenden Membranen bezogen. Die auf dem Human-1.2-Array verwendeten Housekeeping-Gene der Kontroll- und EC-Membran sind in Abb. 16 gezeigt. Abb. 17 zeigt die Schwärzungen der Housekeeping-Gene der TNF- und (EC + TNF)-Membran.

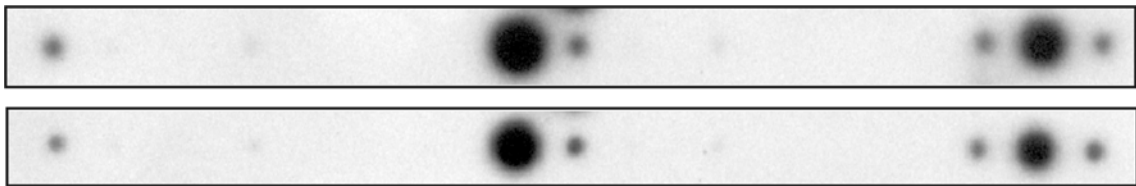


Abb. 16. Clontech Array. Housekeeping-Gene für Kontrolle (oben) und EC (unten). Von links: Ubiquitin C, Glutaraldehyd-3-phosphatdehydrogenase,  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Actin, ribosomales Protein L13a, ribosomales Protein S9; Röntgenfilm für drei Tage aufgelegt.

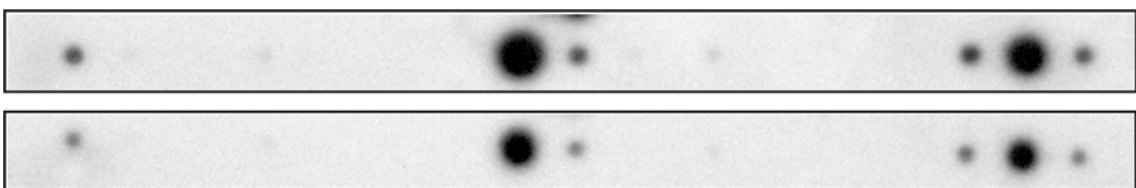


Abb. 17. Clontech Array. Housekeeping-Gene für TNF (oben) und (EC + TNF) (unten). Von links: Ubiquitin C, Glutaraldehyd-3-phosphatdehydrogenase,  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Actin, ribosomales Protein L13a, ribosomales Protein S9; Röntgenfilm für drei Tage aufgelegt.

Es ist deutlich erkennbar, dass die Schwärzung in Abb. 16 bei allen 6 Housekeeping-Genen bei der Kontrollmembran etwas stärker ist als bei der EC-Membran. Dies gilt auch für die TNF-Membran im Vergleich zur (EC + TNF)-Membran in Abb. 17. Daraus lässt sich schließen, dass für die Kontrollexpositionen jeweils mehr m-RNA eingesetzt worden war. Nach Normalisierung durch die Housekeeping-Gene bedeutet dies für die Targetgene eine

Verstärkung der durch die Schwärzung der EC-Membran bzw. (EC + TNF)-Membran errechneten Expression.

### 2.8.1 Exposition mit EC-Partikeln

Es wurden beim Clontech Array auftretende Genexpressionsunterschiede untersucht, die durch die Exposition von A549-Zellen an der LMG mit uf-EC-Partikeln auftraten. In Abb. 18 bis Abb. 21 sind erhöhte Expression für die Gene FRA1, PRKAR1B, ITGB1 und CASP10 nach der Exposition mit EC-Partikeln im Vergleich zur Kontrolle gezeigt.

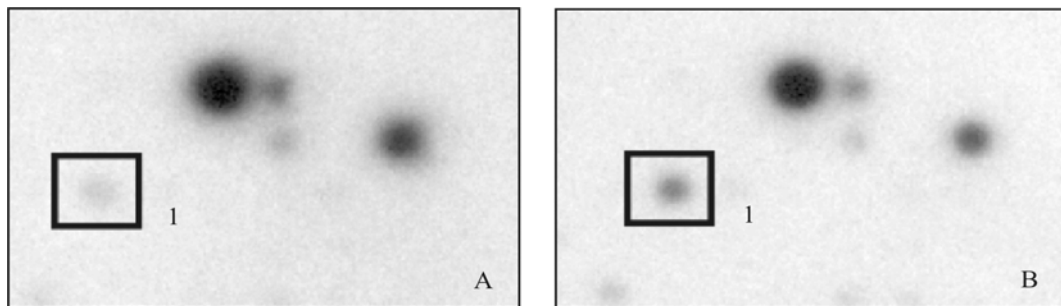


Abb. 18. Clontech-Array. FRA1 (1). Ausschnitt A: Kontrolle; Ausschnitt B: EC. Im Kasten 1 sind Autoradiogramme von FRA1 zu sehen; Röntgenfilm für acht Tage aufgelegt.

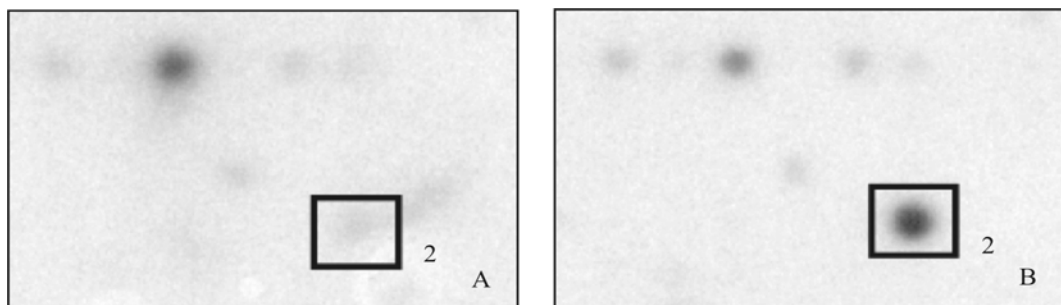


Abb. 19. Clontech-Array. PRKAR1B (2). Ausschnitt A: Kontrolle; Ausschnitt B: EC. Im Kasten 2 sind Autoradiogramme von PRKAR1B zu sehen; Röntgenfilm für acht Tage aufgelegt.

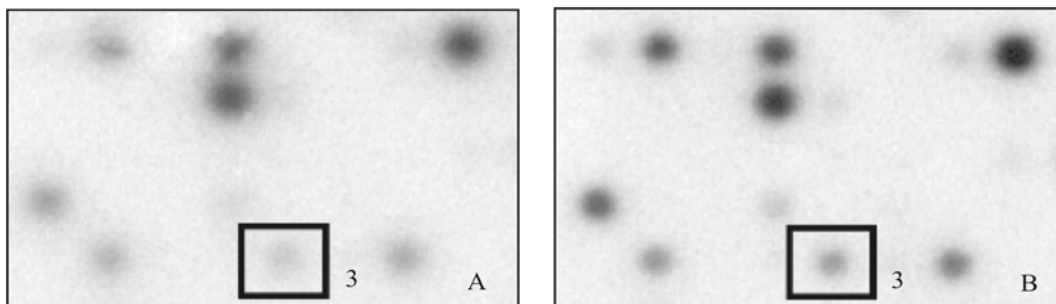


Abb. 20. Clontech-Array. ITGB1 (3). Ausschnitt A: Kontrolle; Ausschnitt B: EC. Im Kasten 3 sind Autoradiogramme von ITGB1 zu sehen; Röntgenfilm für acht Tage aufgelegt.

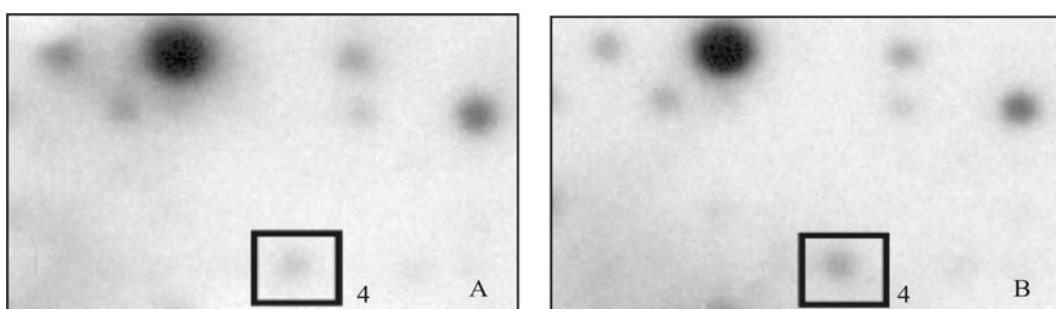


Abb. 21. Clontech-Array. CASP10 (4). Ausschnitt A: Kontrolle; Ausschnitt B: EC. Im Kasten 4 sind Autoradiogramme von CASP10 zu sehen; Röntgenfilm für acht Tage aufgelegt.

In Tab. 12 sind die durch EC induzierten Erhöhungen der Expressionen der oben gezeigten Gene aufgeführt.

Tab. 12. Genexpressionen der EC-exponierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Densitometrische Daten der dargestellten Genexpressionsänderungen für die Gene FRA1, PRKAR1B, ITGB1 und CASP10; MW der veränderten Schwärzung der Röntgenfilme nach einem Tag, drei und acht Tagen.

Name des Gens	Gen-Symbol	Expressions- änderung
Fos-related antigen	FRA1	1,7
cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit	PRKAR1B	15,7
Fibronectin receptor beta subunit (FNRB); integrin beta 1; VLA4 beta subunit; CD29 antigen)	ITGB1	3,8
Caspase-10 precursor; ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin 1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2)	CASP10	2,3

### 2.8.2 Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF

Die Stimulation mit dem proinflammatorisch wirkenden TNF ist eine weitere sensitive Möglichkeit zur Charakterisierung des Zustands der Zellen und ihrer Fähigkeit auf starke Reize zu reagieren. Die A549-Zellen wurden nach 6 h Exposition an der LMG für eine Stunde mit TNF nachinkubiert. Die mit uf-EC-Partikeln exponierten Zellen wurden mit Kontrollzellen, die mit gefiltertem Aerosol für sechs Stunden an der LMG exponiert worden sind, verglichen.

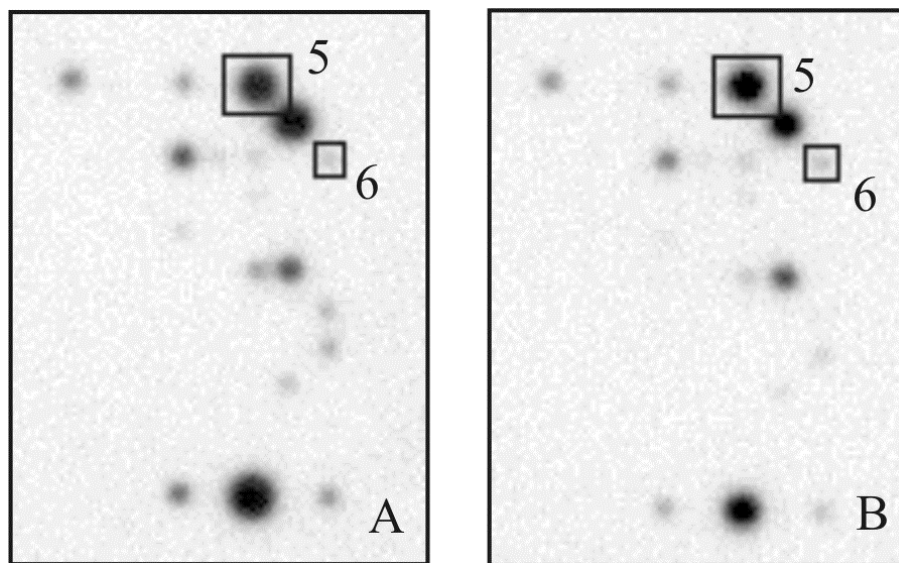


Abb. 22. Clontech-Array. MCP1 (5), IL8 (6). Ausschnitt A: TNF; Ausschnitt B: (EC + TNF). Gekennzeichnet sind Autoradiogramme von MCP1 (5) und IL8 (6). Die Dreierkombination in der unteren Reihe zeigt Housekeeping-Gene. Von links:  $\beta$ -Actin, ribosomales Protein L13a, ribosomales Protein S9; Röntgenfilm einen Tag aufgelegt (zu sehen sind nur sehr stark exprimierte Gene).

Bei den in Abb. 22 gezeigten Genen war die Expression bei der Kombination (EC + TNF) im Vergleich zu TNF als Kontrolle erhöht. IL8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das neutrophile Granulozyten aktiviert. MCP1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten und basophile Granulozyten.

Abb. 23 bis Abb. 25, zeigen drei weitere Gene, deren Expressionen durch (EC + TNF) im Vergleich zu TNF erhöht waren: GCP2, ITGB1 und CASP10.

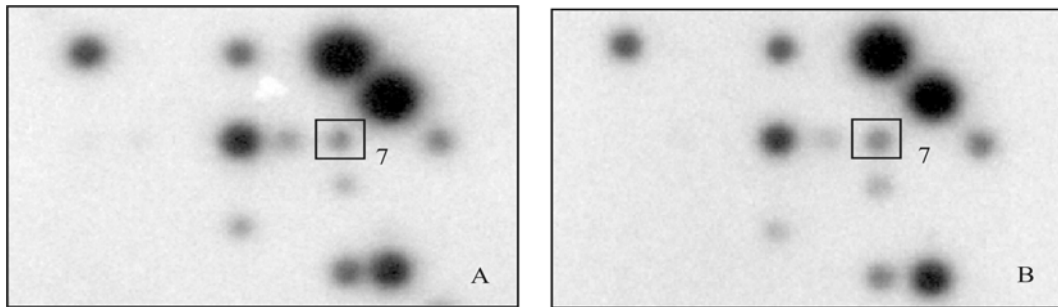


Abb. 23. Clontech-Array. GCP2 (7). Ausschnitt A: TNF; Ausschnitt B: (EC + TNF). Im Kasten 7 sind Autoradiogramme von GCP2 dargestellt; Röntgenfilm für drei Tage aufgelegt.

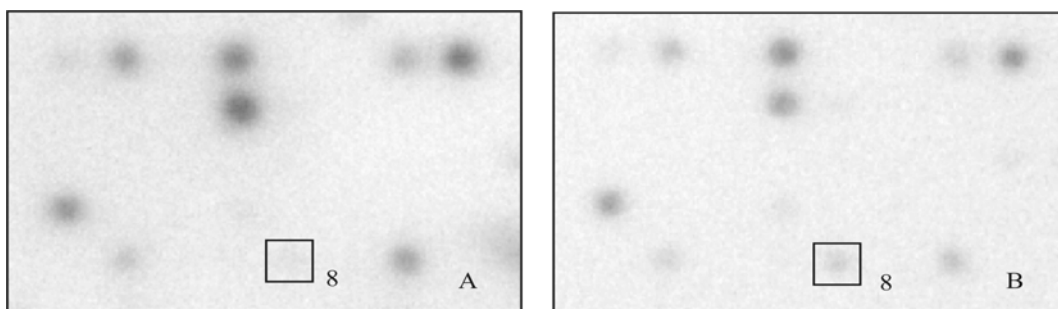


Abb. 24. Clontech-Array. ITGB1 (8). Ausschnitt A: TNF; Ausschnitt B: (EC + TNF). Im Kasten 8 sind Autoradiogramme von ITGB1 dargestellt; Röntgenfilm für drei Tage aufgelegt.

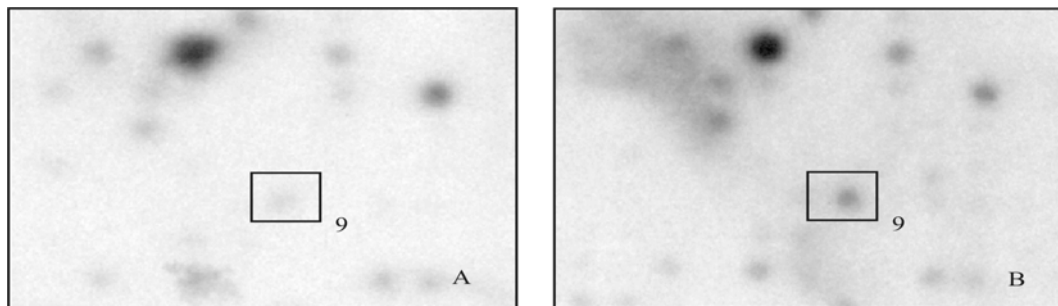


Abb. 25. Clontech-Array. CASP10 (9). Ausschnitt A: TNF; Ausschnitt B: (EC + TNF). Im Kasten 9 sind Autoradiogramme von CASP10 dargestellt; Röntgenfilm für acht Tage aufgelegt.

Tab. 13 vergleicht die densitometrisch ermittelten und nach Formel 1 errechneten Genexpressionserhöhungen der Autoradiogramme von Targetgenen aus Zellen der TNF-Probe (kein Aerosol, 1 h Nachinkubation mit TNF) und Zellen der (EC + TNF)-Probe (6 h mit Aerosol exponiert, 1 h Nachinkubation mit TNF).

Weitere Veränderungen der Genexpression sind tabellarisch im Anhang zu finden.

## 2. Ergebnisse

---

Tab. 13. Genexpressionen von Zellen der (EC + TNF)-Probe im Vergleich zu denen der TNF-Probe. Densitometrische Daten der dargestellten Genexpressionsänderungen für die Gene MCP1, IL8, GCP2, ITGB1 und CASP10; MW der veränderten Schwärzung der Röntgenfilme nach einem Tag, drei und acht Tagen.

Name des Gens	Gen-Symbol	Expressions-änderung
Monocyte chemotactic protein 1 precursor; monocyte chemotactic and activating factor (MCAF); monocyte secretory protein JE; monocyte chemoattractant protein 1; HC11; small inducible cytokine A2 (SCYA2)	MCP1	1,9
Interleukin 8 precursor; monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C	IL8	2,0
Granulocyte chemotactic protein 2; neutrophil-activating peptide ENA-78	GCP2	1,7
Fibronectin receptor beta subunit (FNRB); integrin beta 1; VLA4 beta subunit; CD29 antigen	ITGB1	2,7
Caspase-10 precursor; ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin 1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2)	CASP10	6,5

### 2.8.3 PCR-Verifikation der Clontech-Array-Daten

Der Clontech-Atlas-Array ermöglicht ein Expressions-Screening von 1176 Genen. Da die auf die Membran gespottete DNA auch unspezifische Bindungen mit der radioaktiv markierten c-DNA eingehen kann, sollten die erhaltenen Ergebnisse mit einer anderen Methode verifiziert werden. Dazu wurde die Polymerasekettenreaktion mit dem LightCycler (LC-PCR) durchgeführt. Abb. 26 vergleicht die Ergebnisse von sieben Genen aus dem Clontech-Array mittels LC-PCR, für die die m-RNA-Präparation aus demselben Versuch verwendet wurde.

Die Analyse der m-RNA des „Fos-related antigen“ (FRA1) mittels LC-PCR (1,5-fach) bestätigte eine 1,7-fach erhöhte FRA1-Expression durch EC-Partikel im Array. Durch TNF alleine und in der Kombination mit EC-Exposition (EC + TNF) erhöhte sich die FRA1-m-RNA in der LC-PCR ca. 2- bis 3,5-fach.

Die aus dem Array ermittelte 15,7-fache Hochregulation der „cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit“ (PRKAR1B) durch EC-Exposition konnte mit

der LC-PCR nicht validiert werden. Auch der erniedrigte TNF-Effekt in Kombination mit EC-Partikeln konnte hier nicht bestätigt werden.

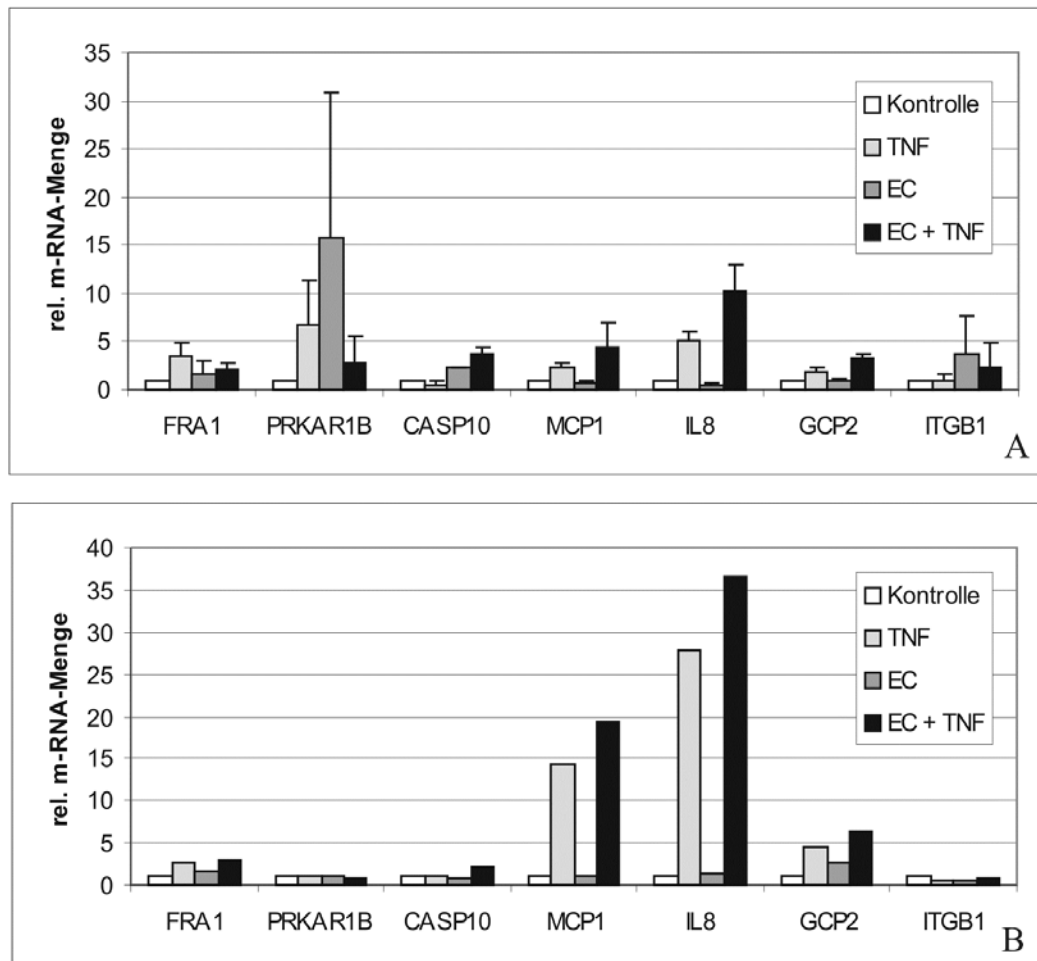


Abb. 26. Clontech-Array-Analyse (MW und SD der drei aufgelegten Filme nach einem Tag, drei und acht Tagen, A) und LC-PCR-Analyse mit m-RNA aus dem Clontech-Array-Versuch (KV20, B) für ausgewählte Gene.

Für die an der Apoptose beteiligte Caspase „Caspase-10 precursor“ (CASP10) ließ sich beim Clontech-Array (6,5-fach) und in der LC-PCR (2,0-fach) eine verstärkte TNF-Wirkung in Kombination mit EC-Partikeln finden. Der stimulierende Effekt durch EC-Partikel alleine, der im Array durch eine 2,3-fach verstärkte Schwärzung deutlich wurden, konnte in der LC-PCR dagegen nicht bestätigt werden.

Ein starker TNF-Effekt wurde für das bei Entzündungen auftretende Chemokin „Monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP1) sowohl im Array als auch in der PCR detektiert. In beiden Ansätzen konnte diese Erhöhung durch die EC-Exposition mit

TNF-Nachstimulation (EC + TNF) (Array +88 %; LC-PCR +35 %) gesteigert werden. Die Expression des Chemokins IL8 in den A549-Zellen verhielt sich bei der Array-Analyse (Abb. 26 A) und bei der LC-PCR-Analyse (Abb. 26 B) wie die MCP1-Expression. Im Array war die TNF-Antwort durch EC-Exposition um 101 % und in der LC-PCR um 31 % erhöht.

Ein anderes in der Studie untersuchtes proinflammatorisches Chemokin ist das „Granulocyte chemotactic protein 2“ (GCP2). Auf der Array-Membran war allein durch EC-Exposition keine Veränderung detektierbar. Bei der PCR hingegen war die GCP2-Expression durch die Partikel 2,7-fach erhöht. Zusätzlich trat beim Array und bei der LC-PCR ein synergistischer Effekt der Partikel in Kombination mit TNF auf (Abb. 26).

Die Erhöhung der m-RNA-Menge für das Integrin beta 1 (ITGB1) durch EC-Exposition im Array um das 3,8-fache geht vor allem auf einen erhöhten Wert auf dem für drei Tage aufgelegten Röntgenfilm zurück. Diese Tendenz konnte in der LC-PCR nicht verifiziert werden. Für ITGB1 wurde beim Array der EC-Effekt durch TNF um 37 % inhibiert (Abb. 26).

### **2.9 Affymetrix-GeneChips**

Die Affymetrix-GeneChip-Microarray-Technology als eine weiterentwickelte Form der c-DNA-Array-Analytik wurde genutzt, da mit dem Clontech-Array Probleme bei der Verifizierung der Daten auftraten. Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wurden die Zellen aus drei Experimenten gepoolt und deren gemeinsame m-RNA in die Analyse eingesetzt. Dadurch konnte auch die benötigte Zellzahl von 4,5 bis  $6 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz erreicht werden. Für die GeneChips wurden für die Exposition mit uf-EC-Partikeln zunächst zwei Dosisintervalle definiert: LOW-DOSE und HIGH-DOSE. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Dosisintervalle wurden anschließend mittels LC-PCR überprüft.

#### **2.9.1 Expositionen mit niedrigen Dosen EC-Partikel (LOW-DOSE)**

Bei den Expositionen an der LMG mit niedrigen Dosen EC-Partikeln wurden bei einer 2 %igen Depositionswahrscheinlichkeit im Mittel  $1,8 \times 10^8$  Partikel pro  $\text{cm}^2$  der bewachsenen Membranfläche beaufschlagt. Dies entsprach einer mittleren Partikelmasse von 95 ng pro  $\text{cm}^2$ . Bei den gepoolten Versuchen handelte es sich um KV28, KV29 und KV31.



### 2.9.1.1 Exposition mit EC-Partikeln

Eine Liste der Gene, die durch Exposition mit einer niedrigen Dosis uf-EC-Partikeln über 1,5-fach reguliert wurden, ist in Tab. 14 dargestellt. Deutliche Unterschiede zwischen den zwei zu vergleichenden Signalen zeigen sich durch hohe Signaldifferenzen. Die interessantesten Ergebnisse (PLXN1, TRCP6, MCJ, PIG11, TLE1, ZNF144 und MUC5B) wurden mittels LC-PRC überprüft (s. 2.9.1.3).

Tab. 14. Affymetrix-GeneChips HG-U133A. Vergleich EC gegen Kontrolle, LOW-DOSE, 6 h Exposition.

Name des Gens	Gen-Symbol	Veränderung p-Wert	Signal-differenz	Expressions-änderung
Plexin C1	PLXNC1	0,000	46,2	15,82
Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	TRPC6	0,000	45,8	11,63
DNAJ domain-containing	MCJ	0,000	40,4	8,82
p53-induced protein	PIG11	0,009	143,8	5,34
Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE1	0,000	88,0	3,05
Zinc finger protein 144 (Mel-18)	ZNF144	0,000	142,6	1,97
Mucin 5, subtype B, tracheobronchial	MUC5B	0,000	210,4	1,91
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	ERBB2	0,000	107,8	1,53
Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	0,999	66,6	-2,42
TL132 protein	LOC220594	0,999	96,7	-2,61
Phosphatidylinositol glycan, class B	PIGB	1,000	88,4	-2,64
Homo sapiens cDNA FLJ33459 fis, clone BRAMY2000585, mRNA sequence	FLJ33459	0,999	51,2	-2,82
Homo sapiens cDNA FLJ20138 fis, clone COL07172, mRNA sequence	FLJ20138	0,999	51,5	-5,91
Chromosome 1 open reading frame 28	C1orf28	1,000	43,4	-11,83

Bei dem Vergleich EC-exponierter Zellen (EC) mit Kontrollzellen (Kontrolle) auf den GeneChips der LOW-DOSE-Expositionen war PIG11 stark reguliert. Nur bei diesem Gen war die Expressionsänderung größer oder gleich 2 und der Signalunterschied über 100. Auch der

p-Wert für die Veränderung entsprach bei PIG11 der Definition für stark regulierte Gene. Die übrigen Gene der Tab. 14 waren schwach reguliert; die Expressionsänderung war  $\geq 1,5$  oder  $\leq -1,5$  und die Signalunterschiede lagen über 40. Die ausführliche Definition für stark und schwach regulierte Gene ist im Kapitel 5.10.2.7 zu finden.

### 2.9.1.2 Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF

Auf zwei weiteren GeneChips wurde die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Zellen durch TNF (Tumor Necrosis Factor) nach EC-Exposition (EC + TNF) an der LMG im Vergleich zu Kontrollzellen (TNF) untersucht. Dazu wurden die Zellen nach 6 h Exposition mit dem Aerosol oder dem gefilterten Aerosol für 1 h submers mit TNF stimuliert.

Tab. 15. Affymetrix-GeneChips HG-U133A. Vergleich (EC + TNF) gegen TNF, LOW-DOSE, 6 h Exposition.

Name des Gens	Gen-Symbol	Veränderung p-Wert	Signal-differenz	Expressions-änderung
Amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	APP	0,000	467,1	1,89
Hqp0376 protein [Homo sapiens], mRNA sequence	Hqp0376	0,001	435,4	1,85
Actin, gamma 1	ACTG1	1,000	3164,5	-1,52
Calreticulin	CALR	0,999	126,3	-1,65
Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	PLA2G2A	1,000	62,7	-3,94
Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	HSPA6	1,000	236,4	-4,25
Ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)	USP7	1,000	78,0	-5,70

Vom gleichen Zell-Material ausgehend sind beim Vergleich der EC-exponierten Zellen, die mit TNF nachstimuliert wurden (EC + TNF) in Tab. 15 andere Gene reguliert, als durch alleinige EC-Exposition in Tab. 14. Die letzten drei Gene in der Tab. 15 (PLA2G2, HSPA6 und USP7) sind die aussichtsreichsten, da hier die stärksten Expressionsänderungen vorlagen. Für HSPA6 liegt ein statistischer Parameter für eine signifikante Abnahme der

Expression (Veränderung p-Wert) von 1,000 vor. Gleichzeitig überschreitet die Differenz zwischen den beiden Expressionssignalen 100 und die Expressionsänderung liegt unter -2. HSPA6 entspricht folglich per Definition einem stark regulierten Gen.

Beim Vergleich TNF versus (EC + TNF) im Affymetrix-Array war HSPA6 das einzige stark regulierte Gen nach LOW-DOSE-Exposition. Alle anderen in Tab. 15 gezeigten Gene waren schwach reguliert. Das folgende Kapitel zeigt unter anderem die Verifikation der Daten für PLA2G2, HSPA6 und USP7.

### 2.9.1.3 Verifikation der Affymetrix-Daten (LOW-DOSE) mittels LC-PCR

Die Ergebnisse der Affymetrix-GeneChips konnten für HSPA6 durch LC-PCR verifiziert werden. Die Expression durch TNF stieg auf den 3,3-fachen Wert der Kontrolle. Durch die Kombination mit EC-Exposition (EC + TNF) wurde eine starke Unterdrückung der Antwort auf TNF-Stimulation durch EC-Partikel nachgewiesen (Abb. 27).

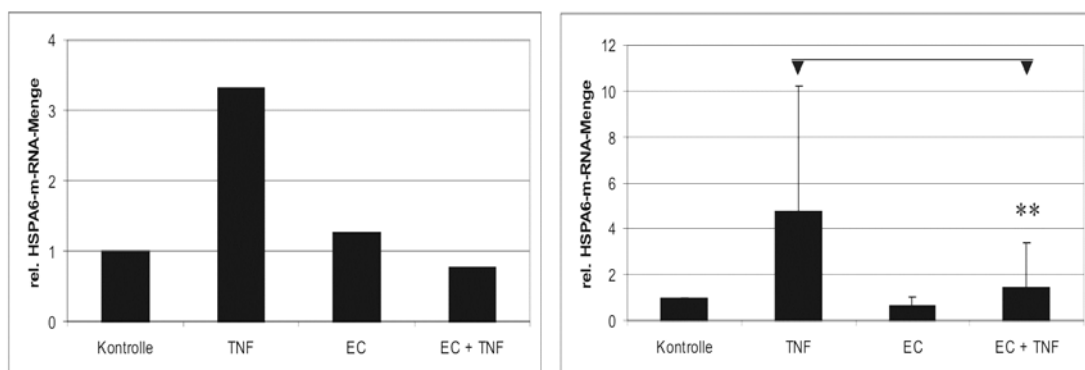


Abb. 27. Vergleich der Affymetrix-GeneChip-Analyse (links) und der LC-PCR (rechts, n = 5) für HSPA6 (LOW-DOSE); MW und SD; \*\* p ≤ 0,01.

Für andere Gene aus Tab. 14 und Tab. 15 konnten die Änderungen der Genexpression der Affymetrix-GeneChips mit der LC-PCR teils nicht verifiziert werden (Abb. 28 B). Beim Gen PLA2G2 jedoch wurde eine 28 % Verringerung der Expression auf den GeneChips nach EC-Exposition durch eine 71 % Verringerung in der LC-PCR bestätigt. Des weiteren konnte mit beiden Verfahren eine Unterdrückung der Genexpression durch TNF nachgewiesen werden; bei den Affymetrix-GeneChips um 75 %, bei der LC-PCR um 42 %. Für PLXNC1, TRPC6 und ZNF144 konnten für die unterschiedlichen Genexpressionen bei TNF und

## 2. Ergebnisse

(EC + TNF) in der LC-PCR die gleichen Tendenzen beobachtet werden wie auf den Affymetrix-GeneChips.

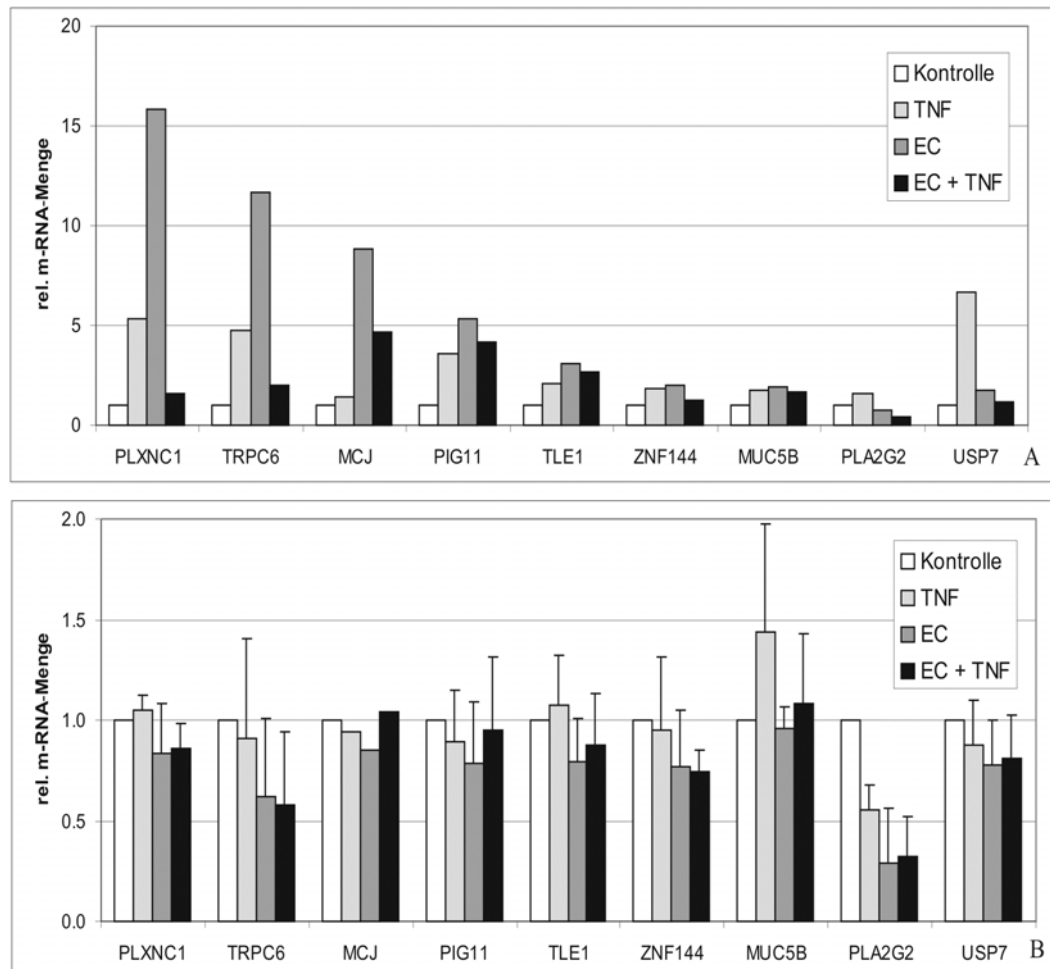


Abb. 28. Affymetrix-GeneChip-Analyse für LOW-DOSE (A) und LC-PCR (KV28, KV29 und KV31; MW und SD; B) für ausgewählte Gene.

### 2.9.2 Expositionen mit hohen Dosen EC-Partikel (HIGH-DOSE)

Analog zu den LOW-DOSE-Expositionen wurden auch für HIGH-DOSE-Expositionen Affymetrix-GeneChip-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden gepoolte Zellen aus den drei Expositionsexperimenten KV32, KV33 und KV34 eingesetzt. Der Mittelwert der in diesen Versuchen pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche deponierten Partikel betrug  $4,4 \times 10^8$  Partikel/ $\text{cm}^2$ . Die zugehörige Massenkonzentration der Partikel betrug 539 ng pro  $\text{cm}^2$  Membran.

### 2.9.2.1 Exposition mit EC-Partikeln

Auch bei den HIGH-DOSE-GeneChips wurden zunächst die Effekte nach Stimulation mit uf-EC-Partikeln für 6 h an der LMG untersucht. In Tab. 16 sind die über 1,5-fach regulierten Gene dargestellt. Für den Vergleich EC-exponierter Zellen mit Kontrollzellen unter HIGH-DOSE-Bedingungen traten nach der Affymetrix-Definition keine stark regulierten Gene auf.

Tab. 16. Affymetrix-GeneChips HG-U133A. Vergleich EC gegen Kontrolle, HIGH-DOSE, 6 h Exposition.

Name des Gens	Gen-Symbol	Veränderung p-Wert	Signal- differenz	Expressions- änderung
Acetylcholinesterase (YT blood group)	ACHE	0,001	47,9	4,90
DC12 protein	DC12	0,000	54,0	4,33
Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	0,001	76,0	2,93
KIAA0186 gene product	KIAA0186	0,000	46,2	1,94
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6 (Drosophila)	MADH6	0,001	68,7	1,92
Complexin 2	CPLX2	0,000	57,8	1,71
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	HNRPH1	1,000	94,4	-1,53
H3 histone, family 3A	H3F3A	1,000	65,1	-1,62
Ribosomal protein S11	RPS11	1,000	251,6	-1,82

Das Gen für ein antiapoptotisches Protein mit der Bezeichnung Survivin (BIRC5) zeigte bei einer Expressionsänderung von 2,93 eine Signaldifferenz von 76,0. Veränderte Genexpressionen nach HIGH-DOSE-Expositionen wurde für dieses Gen sowie für DC12, KIAA0186 und RPS11 durch LC-PCR-Analysen weiter untersucht.

### 2.9.2.2 Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF

Analog zur den LOW-DOSE- wurde auch bei den HIGH-DOSE-Expositionen die Stimulierbarkeit der Zellen durch TNF nach 6 h Partikelexposition an der LMG geprüft. Tab. 17 zeigt Expressionsänderungen zwischen den EC-exponierten Zellen, die mit TNF

## 2. Ergebnisse

---

nachstimuliert wurden und den Kontrollzellen, die zugehörigen p-Werte und Signaldifferenzen. Stark reguliert wurden die Gene ABHD2 und KIAA0870. Bei den Genen FLJ20580, HIF1, FLJ10665 und PTPRN war unter HIGH-DOSE-Bedingungen eine schwache Regulation beim Vergleich TNF gegen (EC + TNF) zu sehen.

Für ABHD2, KIAA0870, FLJ10665 und PTPRN sind LC-PCR-Untersuchungen im Kapitel 2.9.2.3 zu finden.

Tab. 17. Affymetrix-GeneChips HG-U133A. Vergleich (EC + TNF) gegen TNF, HIGH-DOSE, 6 h Exposition.

Name des Gens	Gen-Symbol	Veränderung p-Wert	Signal-differenz	Expressions-änderung
Similar to hypothetical protein PRO2831 [Homo sapiens], mRNA sequence	ABHD2	0,007	110,4	2,69
KIAA0870 protein	KIAA0870	0,001	135,9	2,41
Hypothetical protein FLJ20580	FLJ20580	0,001	81,8	1,59
Huntingtin interacting protein 1	HIF1	1,000	40,4	-1,54
Hypothetical protein FLJ10665	FLJ10665	0,999	49,5	-2,62
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	PTPRN	0,999	43,7	-2,77

Sowohl bei den LOW-DOSE- als auch bei den HIGH-DOSE-Expositionen konnten durch Affymetrix-GeneChips stark regulierte Gene identifiziert werden. Für LOW-DOSE-Expositionen waren dies PIG11 und ZNF144 (Tab. 14). Für LOW-DOSE-Expositionen mit TNF-Nachstimulation im Vergleich zur Kontrolle (EC + TNF gegen TNF) war HSPA6 (Tab. 15) stark reguliert. Die HIGH-DOSE-GeneChips zeigten für ABHD2 und KIAA0870 (Tab. 17) stark veränderte Genexpressionen im Vergleich (EC + TNF) gegen TNF.

### 2.9.2.3 Verifikation der Affymetrix-Daten (HIGH-DOSE) mittels LC-PCR

Die in Abb. 29 A dargestellten Veränderungen der Genexpressionen wurden auf den HIGH-DOSE-GeneChips als allein durch EC-Exposition reguliert oder durch die Kombination (EC + TNF) im Vergleich zu TNF reguliert detektiert. Die durch eine Exposition mit einer hohen Dosis EC-Partikel gefundene Erhöhung der Genexpression bei DC12 (4,3-fach) auf den Affymetrix-GeneChips wurde durch eine 1,8-fache Erhöhung durch

EC-Partikel in der LC-PCR bestätigt (Abb. 29). Auch der um 36 % verstärkte TNF-Effekt in Kombination mit EC-Partikel auf den GeneChips wurde bei DC12 in einer 50 % Erhöhung bei der LC-PCR widerspiegelt. Bei BIRC5 war eine 2,9-fache Erhöhung durch EC-Exposition bei den Affymetrix-GeneChips in der LC-PCR durch eine 1,4-fache Erhöhung angedeutet.

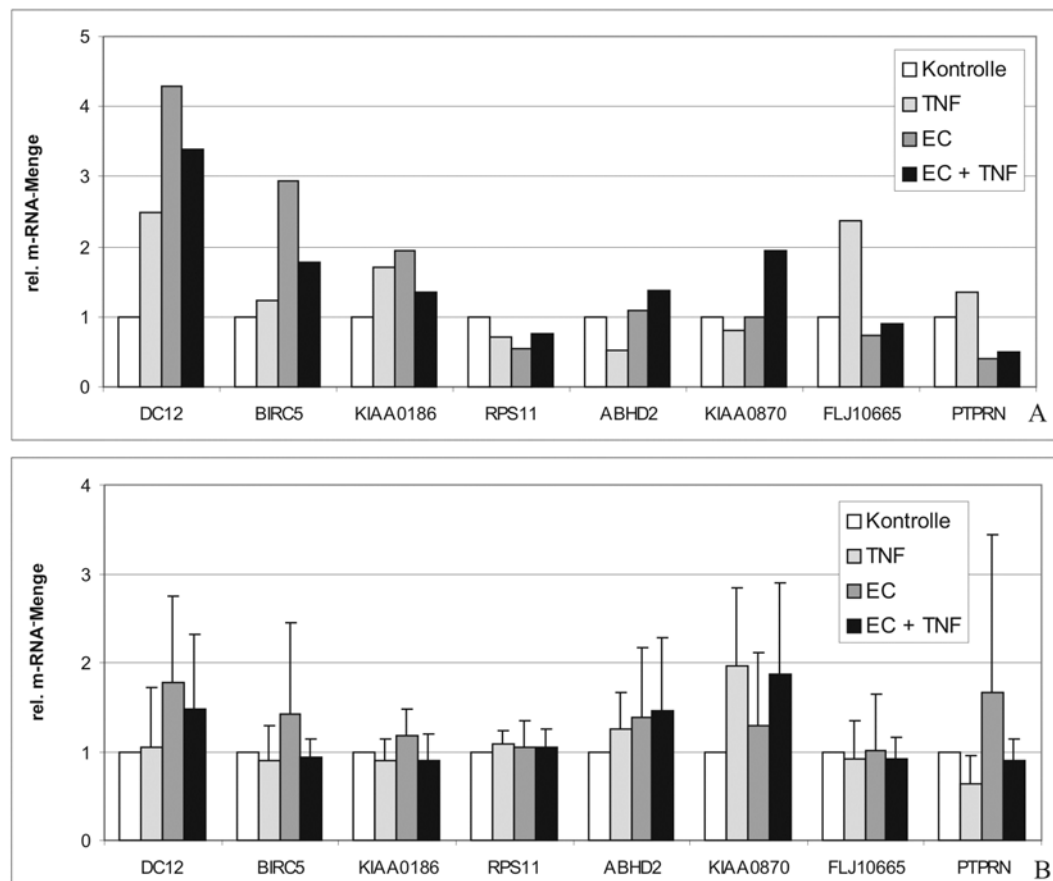


Abb. 29. Affymetrix-GeneChip-Analyse für HIGH-DOSE (A) und LC-PCR (KV32, KV33 und KV34; MW und SD; B) für ausgewählte Gene.

Auch bei KIAA0186 trat nach EC-Exposition die gleiche Tendenz auf. Die übrigen auf den Affymetrix-GeneChips für HIGH-DOSE detektierten Expressionsunterschiede konnten mit der LC-PCR nicht verifiziert werden.

Ein interessantes, bereits aus der Auswertung der LOW-DOSE-GeneChips bekanntes Gen ist das HSPA6. In der LC-PCR zeigten sich auch nach HIGH-DOSE-Expositionen deutliche Effekte. Die Genexpression nach EC-Exposition war um 60 % vermindert (Abb. 46, Seite 65), während der Effekt nach TNF-Stimulation in Kombination mit EC-

Exposition sogar um 80 % vermindert war. Auf den HIGH-DOSE-GeneChips war HSPA6 nur marginal reguliert.

### **2.10 Kultivierungs- und Partikel-bedingte Stressreaktionen: Analyse mittels LC-PCR**

Neben den bisher beschriebenen LC-PCR Analysen zur Verifikation der c-DNA-Microarray-Daten erfolgten weitere LC-PCR Untersuchungen, denen verschiedene Fragestellungen zugrunde lagen. Diese resultierten a) aus der Notwendigkeit die Reaktion von A549-Zellen auf uf-EC-Partikel unter submersen Bedingungen und an der Luft-Medium-Grenzschicht miteinander zu vergleichen, und b) aus bisherigen Erkenntnissen aus den Array-Untersuchungen. Da das HeatShock-Protein HSPA6 (auch als HeatShock-Protein 70 B' bezeichnet) bei den Array-Analysen die deutlichsten Effekte zeigte, wurde sowohl seine Expression, als auch die Expression eines weiteren HeatShock-Proteins, der HO1, in die Untersuchungen mit einbezogen. Darüber hinaus war von Interesse, die Expression von zwei proinflammatorischen Zytokinen (IL8 und IL6) unter submersen Bedingungen bzw. an der LMG zu beschreiben.

Die nachfolgend dargestellten Untersuchungen zur Expression proinflammatorischer Zytokine (IL8, IL6) und von HeatShock-Proteinen (HSPA6, HO1) lassen sich in drei Abschnitte zusammenfassen:

- Reaktion der A549-Zellen in submersen Kulturen als Kontrollen im Vergleich mit A549-Zellen an der LMG, ohne und mit Nachstimulation mit TNF als biologischen Stimulus;
- Reaktionen der A549-Zellen in submersen Kulturen auf Exposition mit EC-Partikel ohne und mit Nachstimulation mit TNF;
- Reaktionen der A549-Zellen an der LMG auf Expositionen mit EC-Partikeln ohne und mit Nachstimulation mit TNF.



## **2.10.1 Stressreaktionen nach Kultivierung von A549-Zellen an der Luft-Medium-Grenzschicht in Abwesenheit von Partikeln**

### **2.10.1.1 Zytokine: IL8 und IL6**

Durch die veränderten Kulturbedingungen an der Luft-Medium-Grenzschicht im Vergleich zu submersen Kulturen reagierten A549-Zellen mit einer modifizierten Transkription inflammatorischer Zytokine, wie IL8 und IL6.

Abb. 30 zeigt die relativen IL8-m-RNA-Mengen der einzelnen Experimente und deren Mittelwerte, nach 6 h Kultivierung unter submersen Bedingungen (Kontrolle submers) oder in der Expositions-kammer an der LMG (Kontrolle-LMG). Im Mittel wurde IL8 durch die LMG um den Faktor 3,0 ( $\pm 2,0$ ) hochreguliert; der höchste und niedrigste Wert wurden dabei in diesem Kapitel nicht berücksichtigt ( $n = 15$ ). Die Reaktion der Zellen nach TNF-Stimulation ist für die submerse (TNF submers) und LMG-Kultur (TNF-LMG) nahezu identisch (Abb. 31). Das Maximum liegt hier im KV36 für TNF submers bei 53,5-facher und für TNF-LMG bei 44,6-facher IL8-m-RNA-Menge. Im Mittel wurde IL8 bei TNF submers um den Faktor 16,2 ( $\pm 10,5$ ) und bei TNF-LMG um den Faktor 16,8 ( $\pm 10,4$ ) hochreguliert.

Ein Vergleich der IL6-Genexpression der submersen Kontrolle mit der Kontrolle-LMG zeigte eine 2,1-fache ( $\pm 0,9$ ) Hochregulation an der LMG (Abb. 32) und ist mit der Expressionsänderung von IL8 vergleichbar.

Wie bei IL8 entsprach auch die durch TNF-induzierte IL6-Transkriptmenge nach 6 h an der LMG derjenigen von submersen Zellen. Im Mittel wurde IL6 bei TNF submers um den Faktor 20,5 ( $\pm 9,6$ ) und TNF-LMG um den Faktor 23,7 ( $\pm 8,9$ ) hochreguliert (Abb. 33).

## 2. Ergebnisse

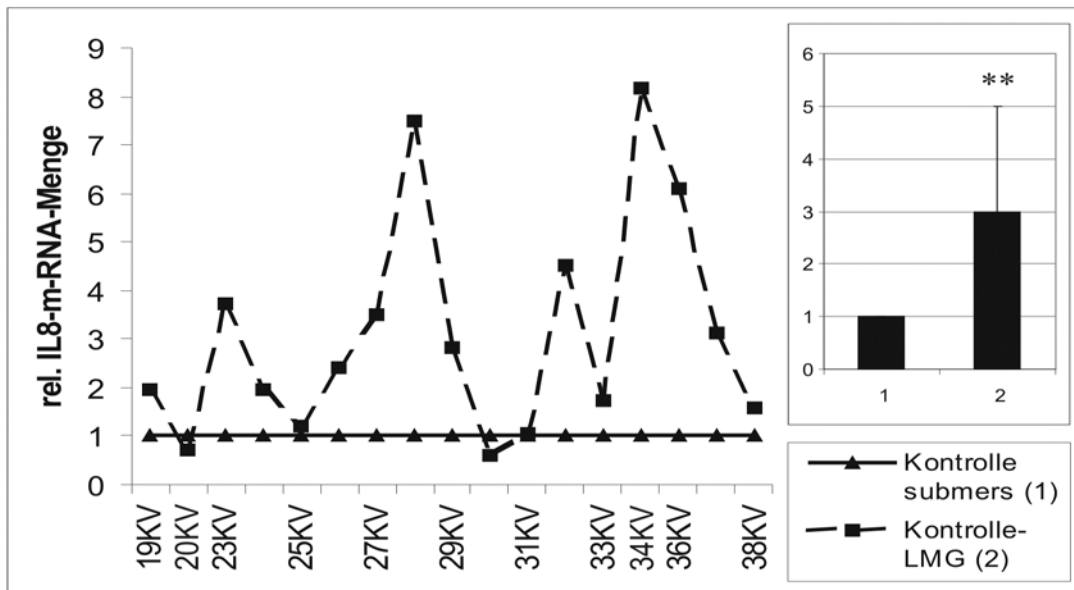


Abb. 30. LC-PCR für IL8. Relative m-RNA-Menge in A549-Zellen: Kontrolle submers (1) und Kontrolle-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert; \*\*  $p \leq 0,01$ . Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

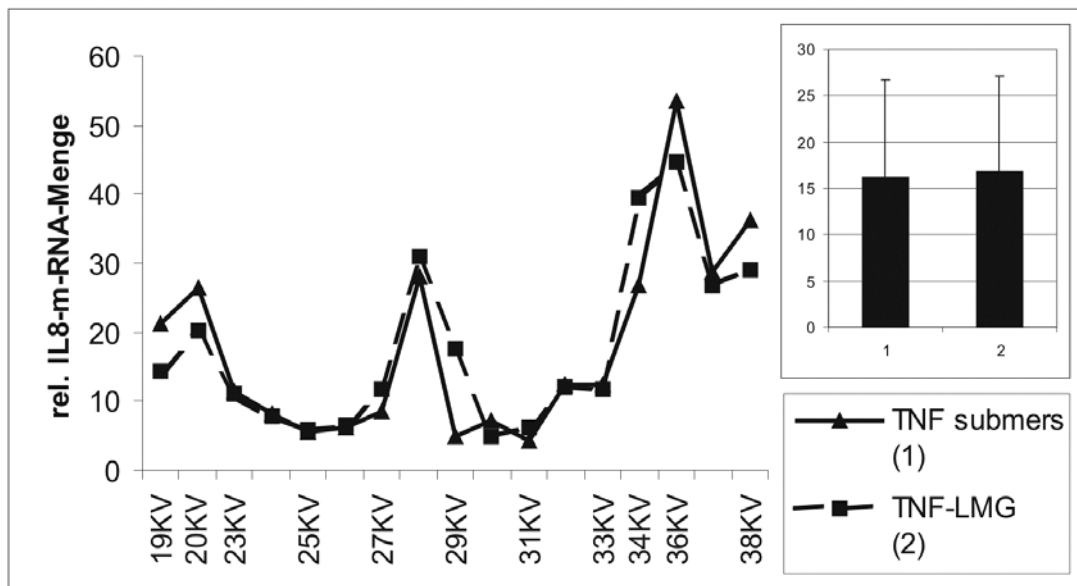


Abb. 31. LC-PCR für IL8. Relative m-RNA-Menge nach TNF-Stimulation in A549-Zellen: TNF submers (1) und TNF-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert. Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

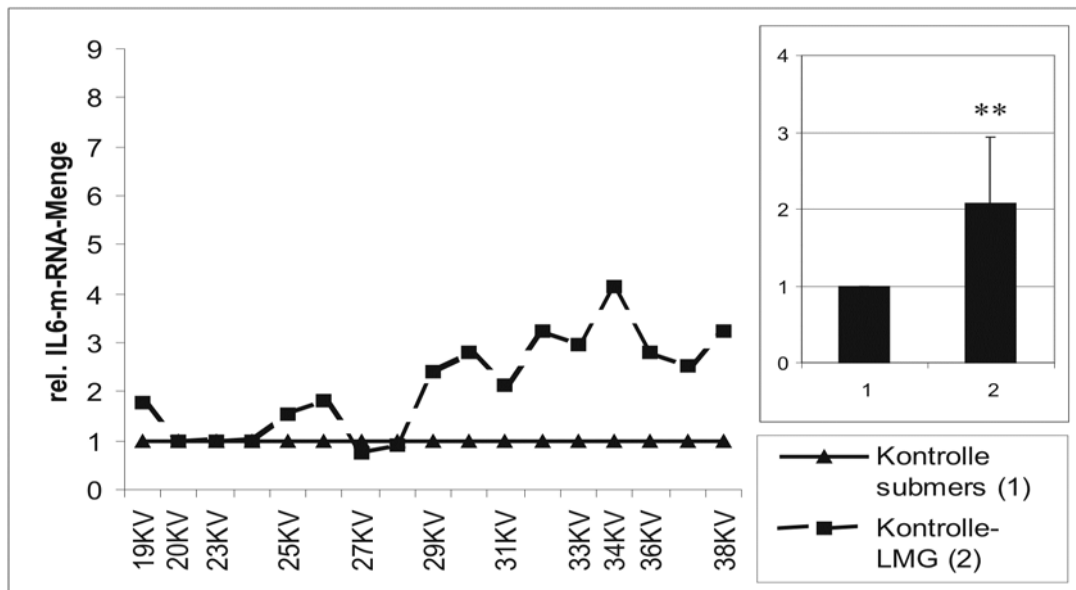


Abb. 32. LC-PCR für IL6. Relative m-RNA-Menge in A549-Zellen: Kontrolle submers (1) und Kontrolle-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert; \*\*  $p \leq 0,01$ . Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

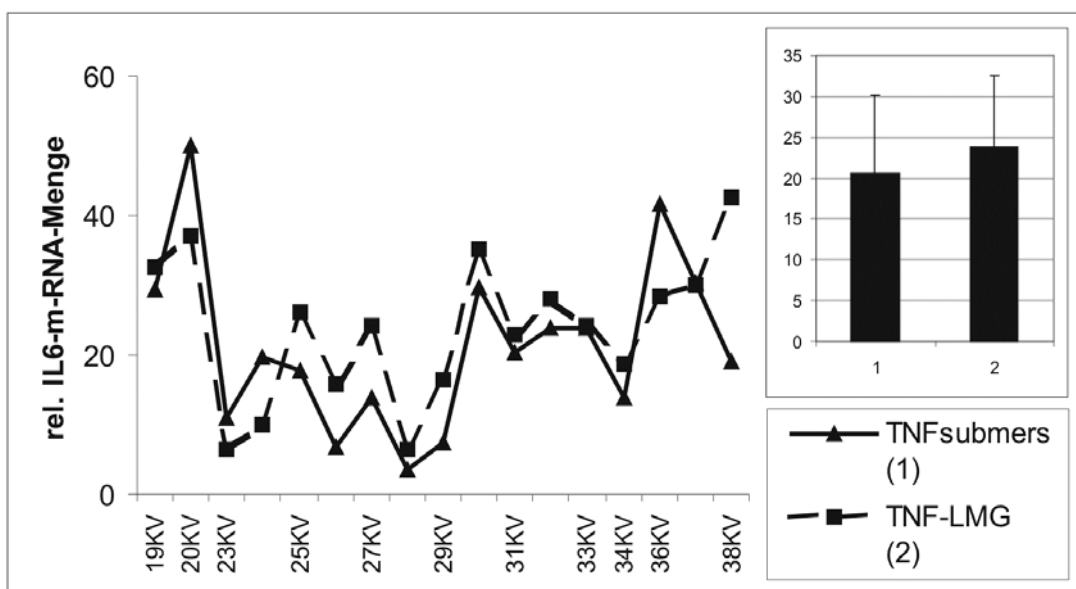


Abb. 33. LC-PCR für IL6. Relative m-RNA-Menge nach TNF-Stimulation in A549-Zellen : TNF submers (1) und TNF-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert. Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

### 2.10.1.2 HeatShock-Proteine: HeatShock-Protein 70B' und Hämoxygenase 1

Die zwei untersuchten HeatShock-Proteine, das HeatShock-Protein 70B' (HSPA6, HSP70B') und die Hämoxygenase 1 (HO1), sind empfindliche Marker für Stressreaktionen in der Zelle. Durch die veränderten Kulturbedingungen an der Luft-Medium-Grenzschicht im Vergleich zu submersen Kulturen zeigten A549-Zellen für die HeatShock-Proteine modifizierte Genexpressionsmuster. Im Gegensatz zu IL8 und IL6 reagierten sie aber kaum auf die Stimulation mit TNF unter submersen Bedingungen.

Eine Exposition der A549-Zellen an der LMG mit Reinluft für 6 h zeigte jedoch in 16 von 17 Versuchen eine erhöhte HSPA6-Expression. Im Mittel stieg die HSPA6-Expression im Vergleich zur submersen Kontrolle um das 27,6-fache ( $\pm 30,6$ ) an (Abb. 34).

Die Expression des HSPA6 nach Stimulation der Zellen mit TNF im Anschluss an eine Reinluftexposition an der LMG für 6 h variierte bei den einzelnen Versuchen sehr stark. Bei zwei Kammerversuchen (30. und 31. KV) exprimierten die TNF-LMG-Zellen eine über 200-fache HSPA6-m-RNA-Menge im Vergleich zur submersen Kontrolle (Abb. 35). Die Zellen des 34. Kammerversuch wiesen ebenfalls eine erhöhte HSPA6-m-RNA-Menge auf. Im Mittel lag für TNF-LMG eine 36,0-fache ( $\pm 66,1$ ) HSPA6-Expression vor; auch in diesem Kapitel wurde bei der Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung der höchste und niedrigste Wert nicht berücksichtigt ( $n = 15$ ). Der Mittelwert der HSPA6-Expression nach submerser Kultivierung und Stimulation mit TNF (TNF submers) war im Vergleich zur submersen Kontrolle um das 1,4-fache ( $\pm 1,3$ ) erhöht.

Das HeatShock-Protein HSPA6 wurde bereits durch die veränderten Kulturbedingungen an der LMG (ohne Partikelexposition!) im Vergleich zur submersen Kontrolle stark induziert, während es durch TNF kaum induzierbar war. Es erwies sich in diesen Untersuchungen als empfindlichster Parameter und wird in Bezug der Interaktionen der A549-Zellen mit EC-Partikeln von großer Bedeutung sein.

Als HeatShock-Protein 32 zählt die HO1 zur selben Proteinfamilie, jedoch zu einer anderen Unterklasse wie das HSPA6. Veränderungen der Genexpression der HO1 waren nach 6-stündiger Kultivierung an der LMG moderater als die des HSPA6.

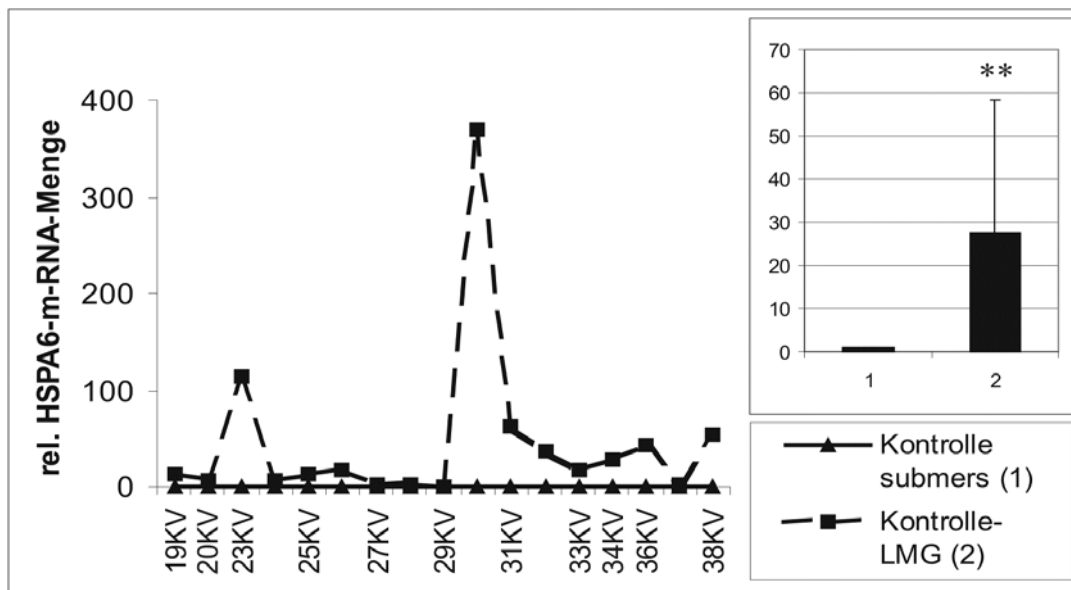


Abb. 34. LC-PCR für HSPA6. Relative m-RNA-Menge in A549-Zellen: Kontrolle submers (1) und Kontrolle-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert; \*\*  $p \leq 0,01$ . Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

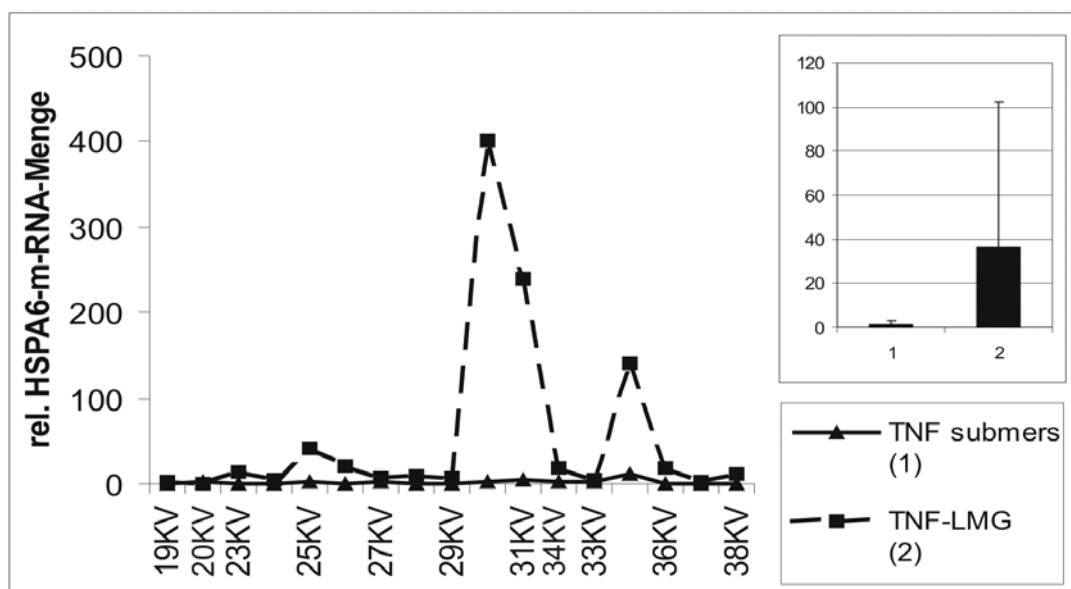


Abb. 35. LC-PCR für HSPA6. Relative m-RNA-Menge nach TNF-Stimulation in A549-Zellen: TNF submers (1) und TNF-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert. Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

## 2. Ergebnisse

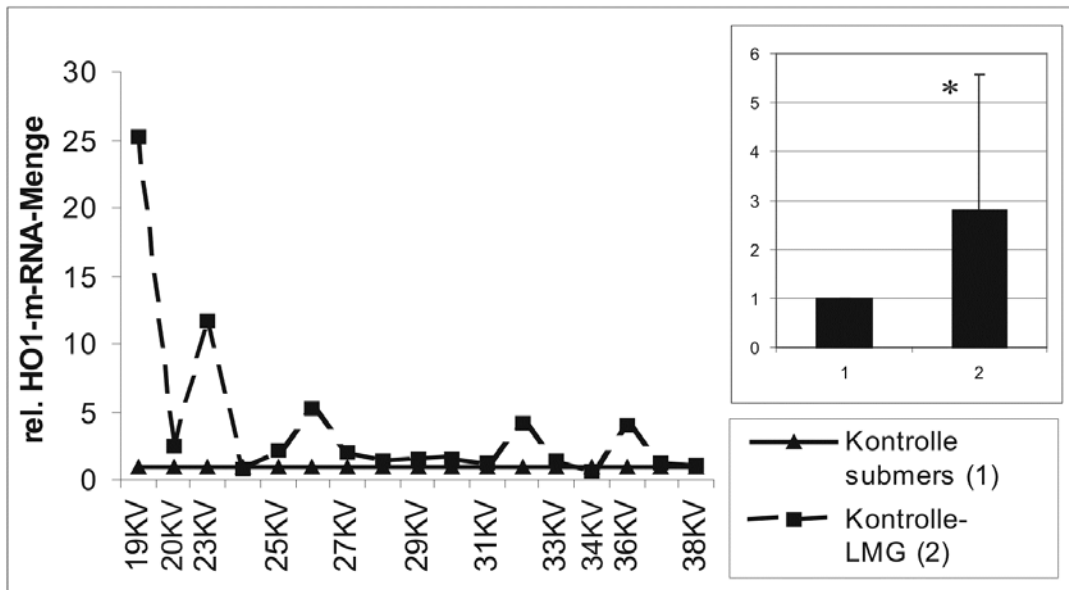


Abb. 36. LC-PCR für HO1. Relative m-RNA-Menge in A549-Zellen: Kontrolle submers (1) und Kontrolle-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert; \*  $p \leq 0,05$ . Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

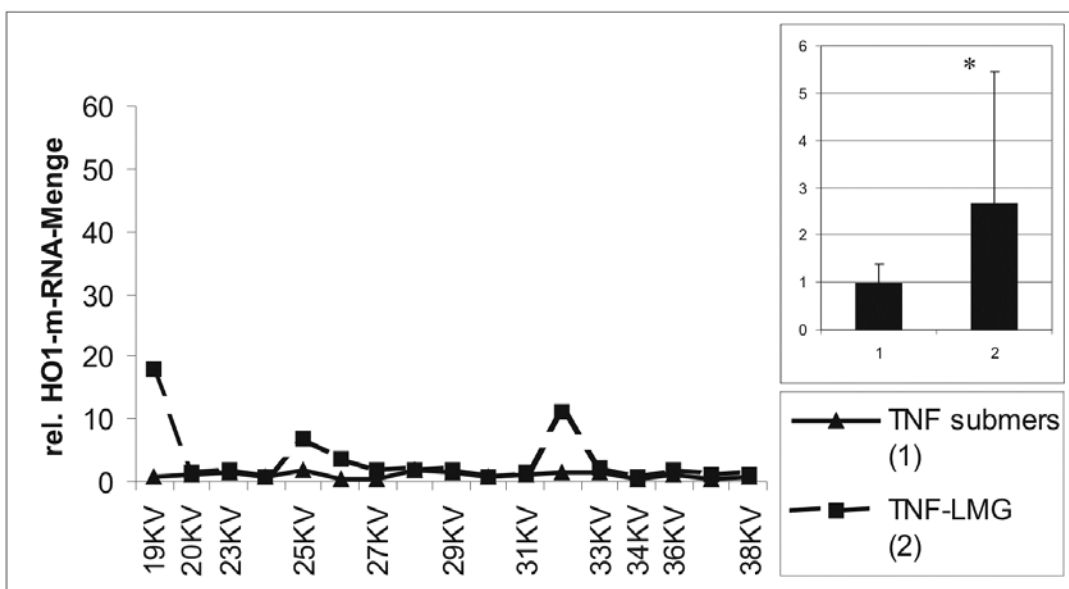


Abb. 37. LC-PCR für HO1. Relative m-RNA-Menge nach TNF-Stimulation in A549-Zellen: TNF submers (1) und TNF-LMG (2); links: einzelne Kammerversuche (KV) 6 h Expositionen; rechts: MW und SD, ohne höchsten und niedrigsten Wert; \*  $p \leq 0,05$  (TNF LMG versus TNF submers). Bei der Auswertung der LC-PCR wurden die Werte der submersen Kontrollen gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte auf 1 normiert.

Der Mittelwert für HO1 lag für die Kontrolle-LMG bei 2,8 ( $\pm$  2,8; Abb. 36). Vergleichbar mit HSPA6 war der fehlende Anstieg der HO1-Transkriptmenge durch TNF unter submersen Bedingungen (TNF submers). Der Mittelwert der relativen HO1-m-RNA-Menge betrug für TNF submers 1,0 ( $\pm$  0,4; Abb. 37). Zellen, die für 6 h an der LMG kultiviert und für 1 h mit TNF nachinkubiert wurden (TNF-LMG), zeigten jedoch in einigen Fällen eine verstärkte HO1-m-RNA-Expression (Abb. 37); der Mittelwert lag bei 2,7 ( $\pm$  2,8).

### 2.10.2 Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln unter submersen Bedingungen

Ein Vergleich mit submers exponierten Zellen half bei der Einschätzung der Relevanz der Expositionen von A549-Zellen mit EC-Partikeln an der LMG. Der übliche Dosisbereich für realitätsrelevante Ansätze bei submersen Kulturen liegt bei 1 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mittels LC-PCR wurde die Expression von IL8, IL6, HSPA6 und HO1 überprüft. Das Studiendesign ist in Abb. 51 (Seite 122) gezeigt.

#### 2.10.2.1 Zytokine: IL8 und IL6

Interleukin 8 (IL8) ist ein proinflammatorisches Chemokin, das für die Migration von Neutrophilen verantwortlich ist und das sehr stark auf die Stimulation mit TNF reagiert.

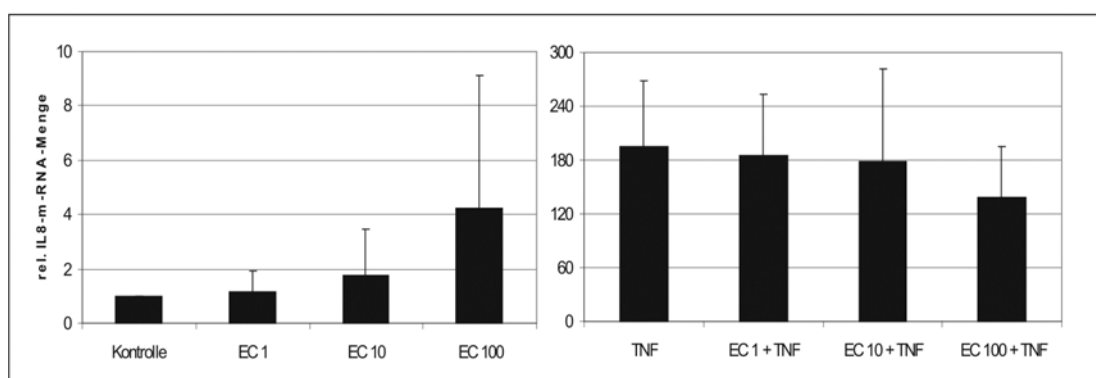


Abb. 38. LC-PCR für IL8; submersive Exposition von A549-Zellen,  $n = 3 - 4$ ; 1, 10, und 100  $\mu\text{g}$  EC/ml und in Kombination mit 30 ng/ml TNF; MW und SD.

Bei Exposition mit EC-Partikeln stieg die IL8-Expression mit zunehmender Partikelkonzentration an und erreichte mit 100 µg EC/ml eine 4,2-fache Erhöhung (Abb. 38). Im Vergleich dazu stieg die IL8-Expression nach Stimulation der submersen A549-Kultur mit TNF auf das 194-fache an. Bei Exposition mit hohen Dosen der EC-Partikel und nachfolgender Stimulation mit TNF (EC + TNF) war dieser Anstieg etwas niedriger; nach Exposition mit 100 µg EC/ml war die IL8-Expression nur noch 138-fach erhöht.

Das Zytokin Interleukin 6 (IL6) spielt in der „Akut-Phase-Reaktion“ eine wichtige Rolle und ist ebenfalls durch TNF induzierbar. Eine mittlere Dosis von EC-Partikeln (10 µg EC/ml) bewirkte ohne Nachstimulation mit TNF eine Erhöhung der IL6-m-RNA-Menge um den Faktor 3,9 (Abb. 39). Unter submersen Bedingungen war nach TNF-Stimulation mit Hilfe der LC-PCR eine 5,3-fache Menge an IL6-m-RNA nachweisbar.

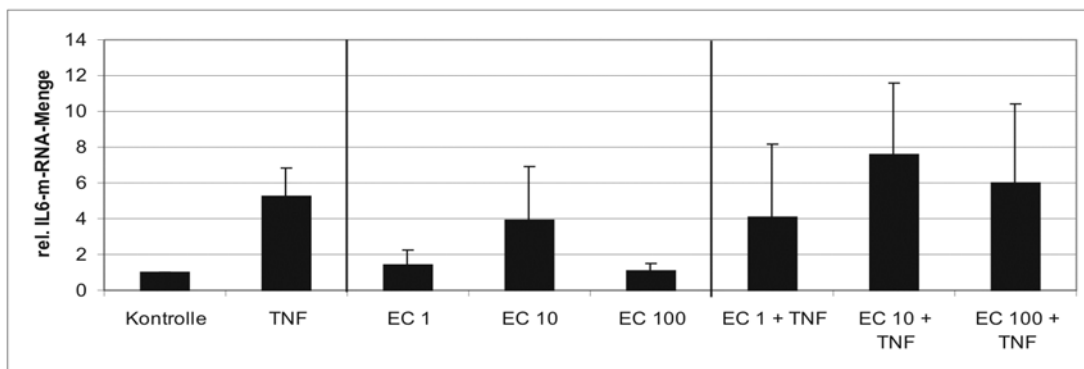


Abb. 39. LC-PCR für IL6; submerse Exposition von A549-Zellen, n = 3 - 4; 1, 10 und 100 µg EC/ml und in Kombination mit 30 ng/ml TNF; MW und SD.

Die Stimulierbarkeit durch TNF nach EC-Exposition (EC + TNF) unterschied sich nicht wesentlich von der Expression der TNF-Kontrolle; eine leichte Verminderung zeigte sich bei der niedrigen (1 µg EC/ml + TNF) und eine leichte Erhöhung bei der mittleren Dosis (10 µg EC/ml + TNF) der EC-Partikel.

### 2.10.2.2 HeatShock-Proteine: HSPA6 und HO1

Die Wirkung der Exposition mit EC-Partikeln ohne und mit TNF als biologischen Stimulus auf die HSPA6-Expression ist in Abb. 40 dargestellt. Bei einer mittleren Konzentration (10 µg EC/ml) der EC-Partikel war die relative m-RNA-Menge für HSPA6



deutlich erhöht, während sie bei niedrigen und hohen Konzentrationen auf dem Niveau der Kontrolle blieb. Durch Stimulation mit TNF stieg das Transkript für HSPA6 um das 5,0-fache an. Bei nachfolgender Stimulation mit TNF war die erhöhte Expression durch TNF in Kombination mit den EC-Expositionen (EC + TNF) unterdrückt. Diese Tendenz zeigte sich bei den submersen Kulturen für alle Dosisbereiche.

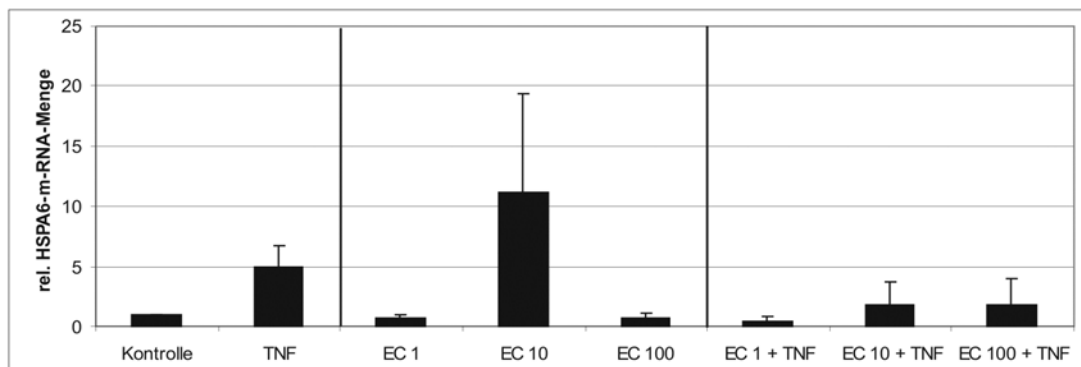


Abb. 40. LC-PCR für HSPA6; submerser Exposition von A549-Zellen, n = 3 - 4; 1, 10 und 100 µg EC/ml und in Kombination mit 30 ng/ml TNF; MW und SD.

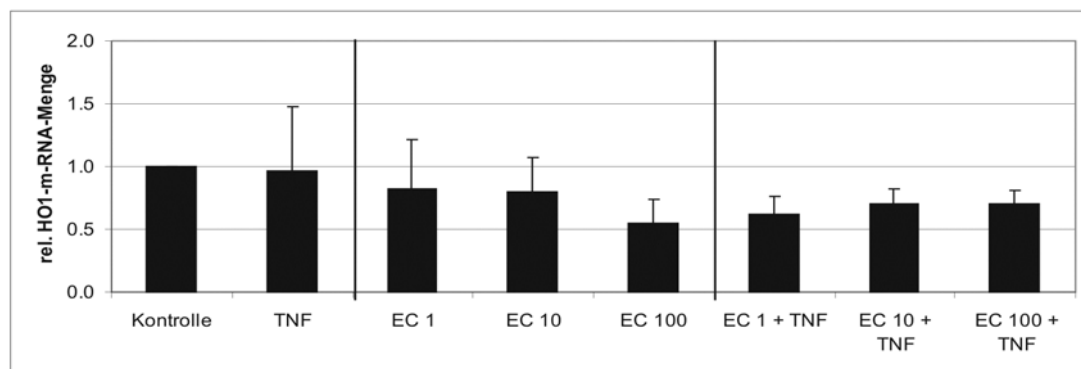


Abb. 41. LC-PCR für HO1; submerser Exposition von A549-Zellen, n = 3 - 4; 1, 10 und 100 µg EC/ml und in Kombination mit 30 ng/ml TNF; MW und SD.

In Abb. 41 ist die HO1-Expression nach Exposition mit EC-Partikeln dargestellt. Die Exposition mit einer niedrigen und mittleren Konzentration von EC-Partikeln hatte fast keinen Einfluss auf die HO1-Transkriptmenge. Mit einer hohen Konzentration von EC-Partikeln (100 µg EC/ml) war die HO1-Expression vermindert. Durch Stimulation mit TNF blieb die HO1-Transkriptmenge unverändert. Die Stimulierbarkeit nach EC-Exposition durch TNF (EC + TNF) war für alle EC-Konzentrationen unterhalb des TNF-Kontrollwerts.

Im Gegensatz zu HSPA6 waren bei HO1 die EC-induzierten Effekte geringfügig. Insgesamt wurde eine suppressive Wirkung der EC-Partikel auf die HO1-Expression erkennbar, während für die HSPA6-Expression eine stimulierende Wirkung durch mittlere EC-Dosen auffällig war.

### **2.10.3 Stressreaktionen nach EC-Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht**

Mit der neu etablierten Expositionskammer wurden die im Abschnitt 5.2.2 (Seite 116) beschriebene Exposition mit uf-EC-Partikeln an der LMG durchgeführt. Nach der Prüfung der Genexpressionsänderungen in Kapitel 2.10.1, die auf die submersen Kontrollen bezogen waren, sind in diesem Kapitel die Expressionsänderungen auf eine Kontrolle an der LMG bezogen. Wie in den Kapiteln 2.10.1 und 2.10.2 wurden Transkriptmengen von Zytokinen (IL8 und IL6) und HeatShock-Proteinen (HSPA6 und HO1) untersucht. Da die Werte nach MID-DOSE-Exposition bei allen untersuchten Genen sehr stark schwankten, wurden die beiden Versuche, die den höchsten und den niedrigsten Wert nach EC-Exposition zeigten, aus den acht MID-DOSE-Expositionen herausgenommen und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen mit  $n = 6$  errechnet.

#### **2.10.3.1 Zytokine: IL8 und IL6**

In Kapitel 2.10.1.1 wurde gezeigt, dass eine Veränderung der Kulturbedingungen mit einer erhöhten IL8- und IL6-m-RNA-Expression an der LMG verbunden war. In diesem Kapitel wird der Effekt auf die Expression dieser Zytokine gezeigt, der durch Exposition mit uf-EC-Partikeln und deren Kombination mit einer Stimulierung mit TNF (EC + TNF) nachweisbar war.

Allein durch die Expositionen mit EC-Partikeln war die IL8-Transkriptmenge bei LOW-DOSE-Exposition im Mittel um das 2,3-fache und bei MID-DOSE-Exposition um das 1,5-fache erhöht (Abb. 42). Unverändert war die IL8-m-RNA-Menge bei HIGH-DOSE-Exposition (0,9-fach). Für IL8 waren keine deutlichen Unterschiede in der TNF-Antwort nach den EC-Expositionen an der LMG zu finden; dies gilt für alle drei verwendeten Dosisbereiche (Abb. 42).

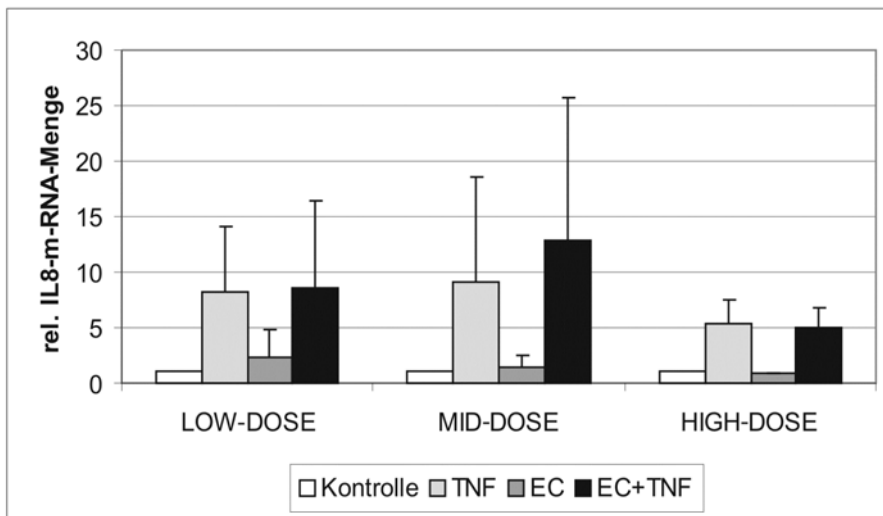


Abb. 42.

LC-PCR für IL8 nach LOW- (n = 5), MID- (n = 6) und HIGH-DOSE-Exposition (n = 4) an der LMG, MW und SD.

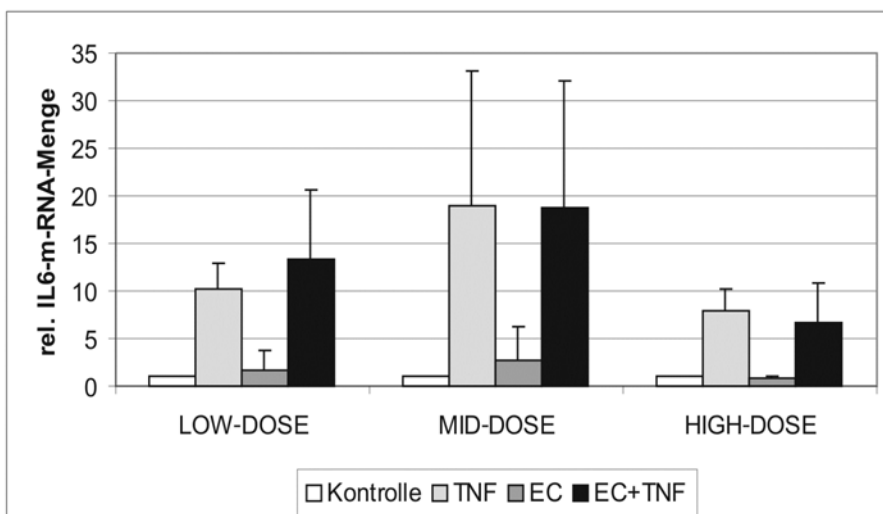


Abb. 43.

LC-PCR für IL6 nach LOW- (n = 5), MID- (n = 6) und HIGH-DOSE-Exposition (n = 4) an der LMG, MW und SD.

Durch die Expositionen mit EC-Partikeln an der LMG traten bei LOW-DOSE eine 1,7-fache und bei MID-DOSE eine 2,7-fache IL6-m-RNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 43). Die EC-Partikel bewirkten in keinem der drei Dosisbereiche eine deutliche Änderung der IL6-Expression nach Stimulation mit TNF.

### 2.10.3.2 HeatShock-Proteine: HSPA6 und HO1

Bereits in Kapitel 2.10.1.2 wurde darauf hingewiesen, dass das HSPA6 und die HO1 empfindliche Marker für eine biologische Antwort während der Exposition an der LMG darstellen. In diesem Kapitel werden die Wirkung von EC-Partikeln, sowie Unterschiede in der Stimulierbarkeit durch TNF nach EC-Exposition (EC + TNF) für HSPA6 und HO1 gezeigt.

In Abb. 44 und Abb. 45 ist die Abhängigkeit der HSPA6- und HO1-Expression in den Einzelversuchen von der Masse der deponierten Partikel dargestellt. In diesen Grafiken wird die erhöhte Expression der HeatShock-Proteine nach den MID-DOSE-Expositionen mit EC-Partikeln deutlich.

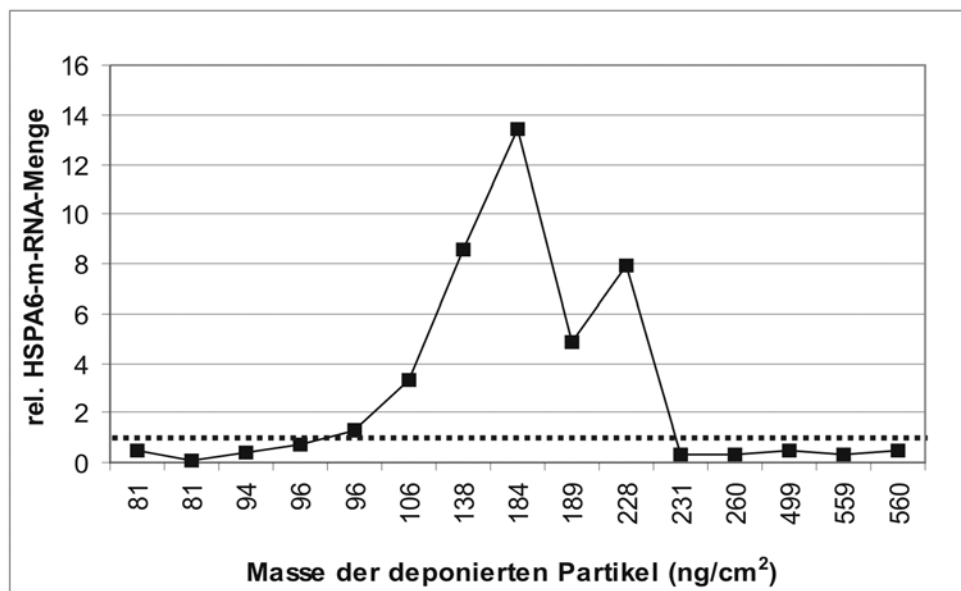


Abb. 44. LC-PCR für HSPA6 nach EC-Exposition für die Einzelversuche. Aufgetragen ist die HSPA6-m-RNA-Menge nach der Masse der deponierten Partikel; LOW-DOSE, 81 – 96 ng/cm<sup>2</sup>; MID-DOSE, 106 - 231 ng/cm<sup>2</sup>; HIGH-DOSE, 260 – 560 ng/cm<sup>2</sup>; bei MID-DOSE ohne höchsten und niedrigsten Wert; gepunktete Linie, Kontrolle-LMG.

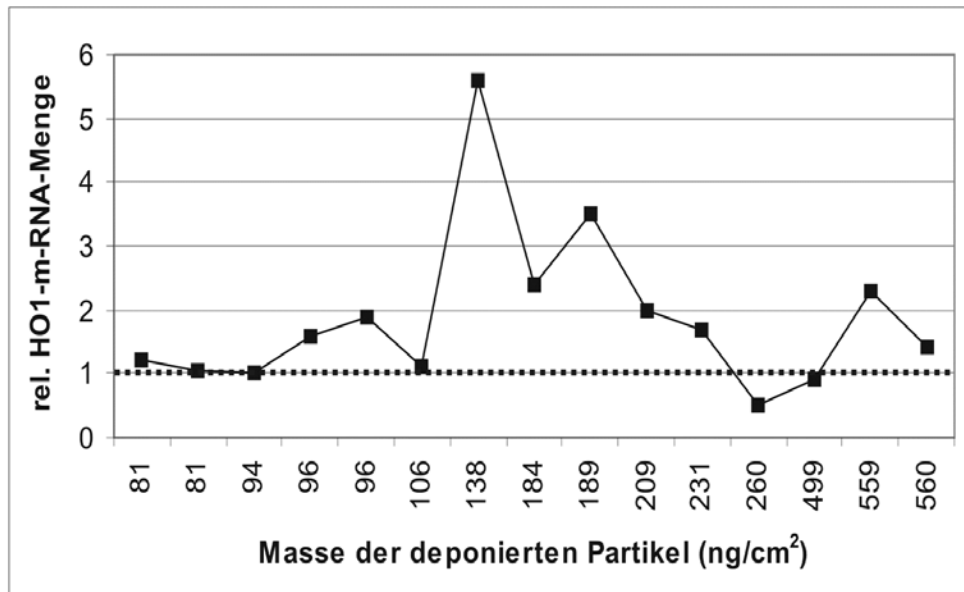


Abb. 45. LC-PCR für HO1 nach EC-Exposition für die Einzelversuche. Aufgetragen ist die HO1-m-RNA-Menge nach der Masse der deponierten Partikel; LOW-DOSE, 81 – 96 ng/cm<sup>2</sup>; MID-DOSE, 106 - 231 ng/cm<sup>2</sup>; HIGH-DOSE, 260 – 560 ng/cm<sup>2</sup>; bei MID-DOSE ohne höchsten und niedrigsten Wert; gepunktete Linie, Kontrolle-LMG.

Zusammengefasst unterschieden sich die HSPA6-Expressionsänderungen sowohl nach LOW-DOSE- als auch nach HIGH-DOSE-Exposition wesentlich von denen nach MID-DOSE-Exposition (Abb. 46).

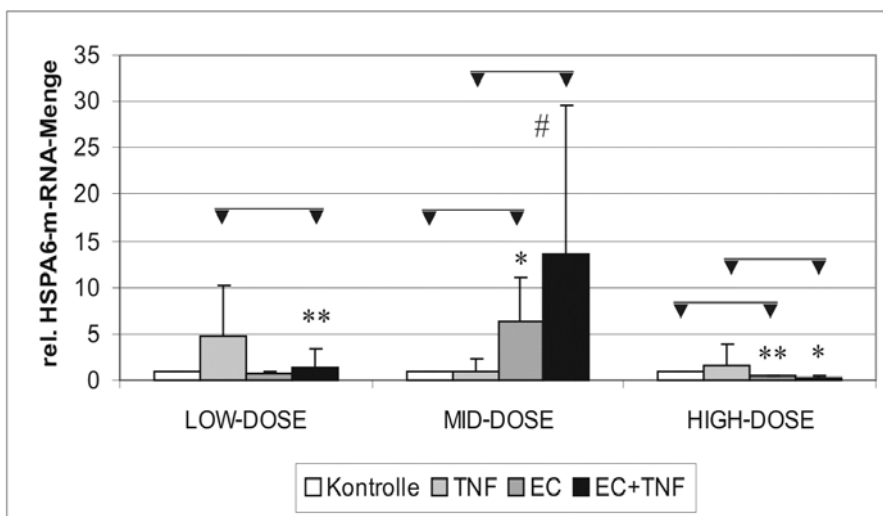


Abb. 46. LC-PCR für HSPA6 nach LOW- (n = 5), MID- (n = 6) und HIGH-DOSE-Exposition (n = 4) an der LMG, MW und SD; \* p ≤ 0,05 (t-Test), \*\* p ≤ 0,01 (t-Test), # p ≤ 0,05 (SR-Test).

Nach MID-DOSE-Exposition mit EC-Partikeln stieg die HSPA6-m-RNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um den Faktor 6,4 an (p ≤ 0,05 im t-Test, p ≤ 0,05 im

SR-Test). Für die EC-Expositionen unter LOW-DOSE-Bedingungen konnte eine leichte Unterdrückung der Genexpression der Kontrolle auf das 0,6-fache und unter HIGH-DOSE-Bedingungen eine deutliche Unterdrückung auf das 0,4-fache ( $p \leq 0,01$  im t-Test) beobachtet werden.

Nach Stimulation mit TNF in Kombination mit MID-DOSE-Exposition (EC + TNF) war die TNF-induzierte m-RNA-Menge signifikant um das 13,5-fache erhöht ( $p \leq 0,05$  im SR-Test). Nach den LOW- und HIGH-DOSE-Expositionen lag jeweils eine deutliche geringerer TNF-induzierten Transkriptmenge vor (0,2-fach,  $p \leq 0,01$  im t-Test; 0,6-fach,  $p \leq 0,05$  im t-Test).

Vergleicht man die Genexpressionsänderungen der einzelnen Dosisintervalle für HO1 (Abb. 47) mit denjenigen für HSPA6 (Abb. 46), so werden Parallelen deutlich. Bei den MID-DOSE-Expositionen mit EC-Partikeln lag für HO1 (2,4-fach;  $p \leq 0,01$  im t-Test,  $p \leq 0,05$  im SR-Test) wie für HSPA6 eine deutliche Steigerung der Expression vor.

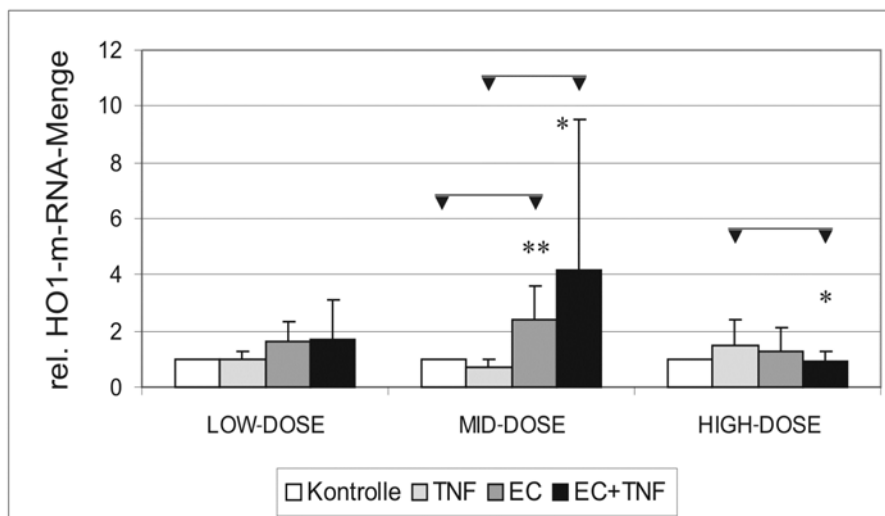


Abb. 47.  
LC-PCR für HO1 nach LOW- (n = 5), MID- (n = 6) und HIGH-DOSE-Exposition (n = 4) an der LMG; MW und SD; \*  $p \leq 0,05$  (t-Test), \*\*  $p \leq 0,01$  (t-Test).

Die Stimulierbarkeit durch TNF nach EC-Expositionen (EC + TNF) war bei den MID-DOSE-Expositionen für HO1 (6,5-fach;  $p \leq 0,05$  im t-Test,  $p \leq 0,05$  im SR-Test) und HSPA6 signifikant erhöht. Für HIGH-DOSE-Expositionen war die Stimulierbarkeit durch TNF bei beiden Genen durch vorhergehende EC-Expositionen signifikant vermindert. Bei den LOW-DOSE-Expositionen stimmten die Tendenzen für HSPA6 und für HO1 nicht überein.

## **3 Diskussion**

### **3.1 Luft-Medium-Grenzschicht-Expositionssystem**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein System etabliert, in dem die Exposition von epithelialen Zellen mit ultrafeinen luftgetragenen Partikeln unter dosimetrischer Kontrolle durchgeführt werden konnte. Dieses Expositionssystem bietet den Vorteil, von der submersen Stimulation mit größeren Agglomeraten von ultrafeinen Partikeln abzukommen und statt dessen relevante Targetzellen an der Grenzschicht zwischen der Aerosol-tragenden Atmosphäre und dem Versorgungsmedium zu kultivieren und sie hier unter realitätsnahen Bedingungen zu exponieren.

#### **3.1.1 Online-Partikeldosimetrie**

Die Exposition von Epithelzellen mit luftgetragenen Partikeln ist ein realitätsnaher Ansatz. Die Partikel deponieren aus dem Aerosol auf die Monolagen-Zellschicht, so dass im Gegensatz zur submersen Exposition keine Agglomeratbildung stattfindet, dafür aber alle Partikel die Möglichkeit haben, mit den Targetzellen zu interagieren. Mehrere Gruppen haben bislang Expositionen an der LMG durchgeführt, wobei u.a. die Wirkungen von Zigarettenrauch und Dieselruß untersucht worden sind (Aufderheide et al., 2001; Cheng et al., 2003a). In diesen experimentellen Ansätzen war eine online-Partikeldosimetrie entweder nicht erforderlich oder nur unzureichend möglich. So hat beispielsweise Cheng et al. bei Exposition mit DEP zwar die Größenverteilung und Konzentration der Partikel im Aerosol gemessen, jedoch ließ sich in diesem System die Anzahl der deponierten Partikel nur grob abschätzen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Expositionssystem basiert auf der kommerziell erhältlichen Minuth'schen Perfusionskammer (Minuth et al., 1996; Minuth and Rudolph, 1990; Minuth et al., 2000; Minuth et al., 1992), die durch eine von Tippe et al. (2002) entwickelte integrierte Dosimetrie erweitert wurde. Die Deposition von Partikeln in der Größe zwischen 75 nm und 1 µm ist abhängig von der Flussrate und der

Partikelkonzentration, jedoch unabhängig von der Partikelgröße. Dabei ergänzen sich Diffusion und Sedimentation näherungsweise zu einer konstanten Depositionsrate (Tippe et al., 2002). Mit einer Flussrate von 250 ml/min pro Membran konnten in den durchgeführten Expositionsexperimenten 2 % der im Aerosol enthaltenen Partikel auf der Membran deponiert werden, wobei durch eine Staupunktströmung eine homogene Verteilung der Partikel auf den Filtern erzielt wurde.

Um die Menge an deponierten Partikel pro Zellfläche zu bestimmen, darf das Aerosol im Expositionssystem weder durch Umgebungsluft verdünnt werden, noch aus den Leitungen des Expositionssystems ausströmen. Eine Quelle für mögliche Undichtigkeit stellt die Expositionskammer selbst dar. Während in der frühen Entwicklungsphase die Einzelkomponenten verklebt waren, wurden in der Endversion die Klebestellen durch Verschraubungen ersetzt, um eine dauerhafte Dichtigkeit zu gewährleisten.

#### **3.1.2 Aerosolbefeuchtung**

Eine Befeuchtung des Aerosols war notwendig, um das Austrocknen der Zellen bei mehrstündigen Expositionen, die Verdunstung des Wasseranteils des Kulturmediums und die daraus resultierende Veränderung der Osmolalität zu verhindern. Dies würde die Zellen in einen Stresszustand versetzen und gegebenenfalls die Expression von Genen bewirken, die sich mit der durch Partikelexposition induzierten Expression überlagern würde. Zur Einstellung einer relativen Feuchte von 99,5 %, wie sie in der Lunge vorliegt (Heyder et al., 2003), wurde zunächst eine kommerzielle Befeuchtungsstrecke, bei der das Aerosol durch ein Nafion<sup>®</sup>-Rohr strömt und dabei Wasserdampf durch die Ummantelung aufnimmt, verwendet. Dies verursachte jedoch ein Druckgefälle von 20 - 40 mm Wassersäule, bedingt durch die nachgeschalteten Pumpen zur Einstellung des Aerosolflusses im System, was letztendlich zu einem Unterdruck in den Expositionskammern führte. Da die Zellmonolage sehr empfindlich auf diese Druckdifferenzen reagierte, wurde die Befeuchterstrecke daraufhin durch ein Glasrohr ersetzt.

Die Befeuchtung des Aerosols über eine Vorbefeuchtungseinheit (siehe 5.2.1.3) und über das nachgeschaltete, mit Filterpapier ausgekleidete Befeuchtungsrohr, erfolgte mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung, um eine Übersättigung und somit Kondensation im System zu verhindern. Der Nachteil des großen Glasrohrs ist eine relativ lange Aufenthaltszeit der



Partikel, was deren Agglomeration fördert (siehe Tab. 3, Seite 21). Sie stellt jedoch für alle Kammerexperimente eine konstante Größe dar und daher ist das verwendete Befeuchtungssystem für diese Zwecke sehr gut geeignet. Ein Druckabgleich zwischen Medium- und Aerosolkompartiment verhinderte zusätzlich die Entstehung von Druckdifferenzen zwischen den beiden Seiten der mit A549-Zellen bewachsenen Membran.

## **3.2 Eigenschaften und Kennzahlen des Aerosols**

Um die Wirkung von Partikeln auf die Epithelzellen richtig einschätzen zu können, war es essentiell, deren charakteristische Eigenschaften zu kennen. Es wird nach wie vor kontrovers diskutiert, welche Eigenschaften (Größe, Zusammensetzung, Matrix usw.) der Partikel die deutlichsten Auswirkungen auf das humane Alveolarepithel und allgemein auf die Lunge haben. Da in zahlreichen Arbeiten unterschiedliche Effekte beschrieben worden sind, lässt sich bislang noch kein einheitliches Bild der Wirkung von Partikeln darstellen.

### **3.2.1 Beeinflussung des Aerosols durch das Expositionssystem**

Das für die Exposition der Zellen verwendete Aerosol wurde nach Generierung im GFG1000-Funkengenerator mit Argon verdünnt. Über eine weitere Verdünnung mit einem definierten Volumen gefilterter Raumluft und Ergänzung von CO<sub>2</sub> auf einen Gehalt von 5 % wurde die Partikelkonzentration eingestellt. Charakteristische Parameter wie Anzahlkonzentration und Durchmesser wurden an verschiedenen Positionen des Expositionssystems kontrolliert. Mit einem bei 60 Hz erzeugten unbefeuchteten Aerosol wurde mit zunehmender Entfernung vom Generator bis zur Austrittsstelle des Aerosols aus den Expositionskammern eine Zunahme des CMD um 52 % und eine Abnahme der Partikelkonzentration um 74 % gemessen (Tab. 3, Seite 21). Vergleichbar hierzu wurde auch beim auf 99,5 % rF befeuchteten Aerosol eine Zunahme der Partikelgröße (um 60 %) und eine Abnahme der Partikelkonzentration (um 64 %) zwischen Aerosolverdünnung und Austrittsstelle aus den Kammern beobachtet. Im befeuchteten Zustand agglomerierten die Aerosolpartikel demnach im selben Maße wie im unbefeuchteten Zustand.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Anhebung der Temperatur im Expositionssystem von Raumtemperatur auf 37 °C diese Tendenzen nicht verändert. Vor

allem bei der Generierung von Aerosol bei einer Funkenfrequenz von 240 Hz, der Einstellung, die bei den Kammerexperimenten letztendlich verwendet wurde, sind nur geringe Veränderungen in der Partikelkonzentration und Größe bei der Anhebung der Aerosoltemperatur gemessen worden (Tab. 4, Seite 23).

Im gefilterten Aerosol, das als Kontrollatmosphäre für die Exposition benutzt wurde, waren noch geringe Partikelkonzentrationen bzw. Restmassen vorhanden. Es ist anzunehmen, dass diese nicht aus dem Generator stammten, da seine Abschaltung keinen Unterschied bewirkte (Tab. 6, Seite 24). Vielmehr könnten Kontaminationen an den Wänden der Schlauchverbindungen Ursache dieser Restmasse sein. Ihre Konzentration ist jedoch im Vergleich zum generierten Aerosol bei 240 Hz vernachlässigbar klein.

*Auf dem Weg durch das Expositionssystem agglomerierte das befeuchtete EC-Aerosol in demselben Maße wie das unbefeuchtete Aerosol. Die Anhebung der Temperatur von RT auf 37 °C hatte nur einen geringen Einfluss auf Partikelgröße und -konzentration.*

### **3.2.2 Dosisbereiche für die Expositionen**

#### **3.2.2.1 Submerse Expositionen**

Bei den submersen Expositionen kann wegen der Agglomeratbildung keine Anzahlkonzentration, sondern nur die Massenkonzentration der Partikel in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben werden. In den hier vorliegenden Studien wurden unter submersen Bedingungen  $0,5 \times 10^6$  A549-Zellen in 0,5 ml Medium auf  $1,9 \text{ cm}^2$  Fläche ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von 18 h lagen ungefähr  $10^6$  Zellen vor. Die eingesetzte Partikelkonzentration variierte zwischen 1 und  $100 \mu\text{g EC/ml}$ .

*Die Partikeldosen für submerse Expositionen betragen  $1 \mu\text{g EC/ml}$  für die niedrige,  $10 \mu\text{g EC/ml}$  für die mittlere und  $100 \mu\text{g EC/ml}$  für die hohe Dosis. Dies entspricht einer Massenkonzentration der Partikel von  $0,3 - 30 \mu\text{g/cm}^2$  oder  $0,5 - 50 \mu\text{g}/10^6$  Zellen.*

### 3.2.2.2 Expositionen an der Luft-Medium-Grenzschicht

Für die Exposition an der Luft-Medium-Grenzschicht wurden drei Dosisbereiche definiert: LOW-, MID- und HIGH-DOSE. Die Konzentrationen und der Durchmesser der Partikel an der LMG sind für die Anzahl und die Masse in Kapitel 2.3 dargestellt. Für die chronologisch zuerst verwendeten Clontech-Arrays wurden Zellen aus einer Exposition mit einer MID-DOSE-Konzentration von  $2,7 \times 10^8$  Partikel/cm<sup>2</sup> als Pilotstudie eingesetzt. Weitere MID-DOSE-Expositionen wurden ausschließlich für die Analyse mittels LC-PCR durchgeführt. Für die später verwendeten Affymetrix-GeneChips erfolgten Expositionen im LOW- und HIGH-DOSE-Bereich. Bei den LOW-DOSE-Expositionen wurden durchschnittlich  $1,9 \times 10^8$  Partikel pro cm<sup>2</sup> Membranfläche abgeschieden und bei den HIGH-DOSE-Expositionen  $4,4 \times 10^8$  Partikel/cm<sup>2</sup>. Obwohl der Anstieg der Partikelkonzentration von LOW-DOSE zu MID-DOSE um 44 % und von MID-DOSE zu HIGH-DOSE um 64 % relativ gering ist, sind entscheidende Unterschiede in den Genexpressionen erkennbar (siehe Kapitel 2.10.3). Betrachtet man die durchschnittlichen Partikelmassen, so wurden pro cm<sup>2</sup> Membranfläche bei den LOW-DOSE-Experimenten 90 ng ( $\pm 8$ ), bei den MID-DOSE-Experimenten 196 ng ( $\pm 56$ ; 118 % mehr im Vergleich zu LOW-DOSE) und bei HIGH-DOSE 470 ng ( $\pm 143$ ; 140 % mehr im Vergleich zu MID-DOSE) deponiert. Die prozentual größeren Abstände zwischen den Dosisintervallen in der Massenkonzentration im Vergleich zur Anzahlkonzentration sind auf einen zunehmenden Durchmesser der Partikel bei steigender Partikelkonzentration zurückzuführen.

Für ultrafeine Partikel stellt die große spezifische Oberfläche ein wichtiger Parameter hinsichtlich der Partikelwirkung dar. In dem hier beschriebenen Expositionssystem wurde die Belastung der Targetzellen über die Anzahl der deponierten Partikel definiert. Hieraus kann die Partikelmasse bei einer geschätzten Partikeldichte von  $0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  näherungsweise berechnet werden. Eine Konzentrationsangabe in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wie bei den submersen Kulturen ist jedoch problematisch, da die auf den Zellen befindliche Flüssigkeitssäule sehr dünn und nicht zu quantifizieren ist. Statt dessen wird die Konzentration bevorzugt als Anzahl deponierter Partikel/cm<sup>2</sup> oder Masse deponierter Partikel/cm<sup>2</sup> Zellrasen angegeben. Da die Zellen den Großteil der Membranfläche belegen (Kapitel 2.6.1), ist diese Abschätzung zuverlässig.

Ein Vergleich mit abgeschätzten Partikelkonzentrationen, die *in-vivo* in der menschlichen Lunge deponieren, soll die Relevanz der in den LMG-Expositionen verwendeten Partikeldosen verdeutlichen. Bei 15 Atemzügen pro Minute mit einem

Atemzugvolumen von  $500 \text{ cm}^3$  werden pro Minute  $7500 \text{ cm}^3$  Luft inhaliert. Nimmt man eine Konzentration von  $10^5$  Partikeln/ $\text{cm}^3$  in der Luft einer verkehrsreichen städtischen Umgebung an, so werden bei einer Depositionsrate von 30 % ca.  $2,5 \times 10^8$  Partikel pro Minute auf dem Alveolarepithel deponiert. Nach einer 6-stündigen Inhalation werden insgesamt  $9 \times 10^{10}$  Partikel auf der alveolären Oberfläche deponiert, die nach Stone et al. (1992) ca.  $102 \text{ m}^2$  ( $1,02 \times 10^6 \text{ cm}^2$ ) beträgt. Aus diesen Angaben resultiert eine Partikeldichte von ca.  $9 \times 10^4$  deponierter Partikel pro  $\text{cm}^2$  Alveolarepithel.

Aus der erwähnten Studie geht außerdem hervor, dass das humane Alveolarepithel aus ca.  $5 \times 10^{10}$  Typ-I- und Typ-II-Zellen besteht, wobei die beiden Zelltypen im Verhältnis 2:3 auftreten. Dabei nehmen die Typ-I-Zellen ca. 94 % und die Typ-II-Zellen nur 6 % der alveolären Oberfläche ein. Auf  $1 \text{ cm}^2$  Epithelfläche entfallen durchschnittlich  $5 \times 10^4$  Epithelzellen. Bei der Deposition von  $9 \times 10^4$  Partikel/ $\text{cm}^2$  alveolärer Epithelfläche nach obiger Abschätzung werden auf 100 Epithelzellen (2/5 Typ-I-Zellen und 3/5 Typ-II-Zellen) im Durchschnitt 180 Partikel deponiert. Unter Berücksichtigung der sehr unterschiedlichen Flächenausdehnung der beiden Zelltypen entfallen auf 100 Typ-I-Epithelzellen 420 Partikel und auf 100 Typ-II-Epithelzellen etwa 18 Partikel.

Bei den *in-vitro*-Expositionsexperimenten an der LMG wurden über einen Zeitraum von 6 h ca.  $3 \times 10^8$  Partikel pro  $\text{cm}^2$  deponiert (MID-DOSE-Exposition). Bei einer Zelldichte von ca.  $10^6$  Typ-II-Epithelzellen pro  $\text{cm}^2$  sind dies 30000 Partikel/100 Zellen. Die Partikeldosis pro Zelle ist also in Vergleich zur *in-vivo*-Inhalation an einem verkehrsreichen Standort ca. 70-fach erhöht, wenn man sich auf Typ-I-Zellen und ca. 1700-fach erhöht, wenn man sich auf Typ-II-Zellen bezieht. Im Mittel ist die Partikeldosis pro Epithelzelle etwa 170-fach erhöht.

Die Abschätzung der Partikeldosis pro Zelle nach *in-vivo*-Inhalation erfolgte mit einer umweltrelevanten Partikelkonzentration ( $10^5$  Partikel/ $\text{cm}^3$ ), von der nach einer 6-stündigen Exposition noch keine akuten biologischen Effekte zu erwarten sind. Um solche jedoch zu identifizieren und ihre Mechanismen zu studieren, wurden bei den Expositionen an der LMG bewusst höhere Partikelkonzentrationen gewählt.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass die lokale *in-vivo*-Dosis von Partikeln in der peripheren Lunge signifikant von der mittleren *in-vivo*-Dosis abweichen kann. Nach Untersuchungen mehrerer Autoren kann unmittelbar an den Verzweigungen (Bifurkationen) im Bereich der Alveolargänge im Vergleich zu nicht verzweigten benachbarten Strukturen der

Lungenperipherie eine deutlich erhöhte Partikeldeposition erfolgen (Maier et al., 1999; Osornio-Vargas et al., 1991; Warheit et al., 1984).

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass eine über Jahre andauernde chronische Exposition bei einer *in-vivo*-Partikelkonzentration, wie sie in der obigen Abschätzung verwendet worden ist, durchaus schädliche biologische Effekte induzieren kann. Dies trifft insbesondere für Kinder und ältere Personen, sowie Personen mit bestehenden Atemwegserkrankungen oder genetischer Prädisposition zu.

*Für die Analyse der Genexpression mit Hilfe des Clontech-Array sind Zellen einer einzigen MID-DOSE-Exposition verwendet worden, während für die Affymetrix-GeneChips jeweils Zellen aus drei Kammerexperimenten sowohl nach LOW-DOSE-Expositionen als auch nach HIGH-DOSE-Expositionen gepoolt worden sind. Für die LC-PC-Untersuchungen mittels der LightCycler-PCR-Technologie wurden Zellen mehrerer Kammerexperimente aus der LOW-, MID- und HIGH-DOSE-Exposition jeweils separat analysiert. Bei einer mittleren Zelldichte von etwa  $1 \times 10^6$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Anodisk-Membran, variierte die verwendete Dosis über die drei Dosisintervalle zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{g uf-EC}/10^6$  Zellen. Die Dosisbereiche für Expositionen an der LMG liegen deutlich unter denen, die für Expositionen unter submersen Bedingungen gewählt worden waren. Im Vergleich mit der Anzahl von *in-vivo* deponierten Partikeln pro Zelle nach sechs Stunden in verkehrsreicher Umgebung, ist die mittlere deponierte Partikelanzahl pro Zelle im LMG-Expositionssystem 170-fach erhöht.*

### **3.2.3 Oberflächeneigenschaften der uf-EC-Partikel**

Untersuchungen haben gezeigt, dass die durch den Funkengenerator erzeugten EC-Partikel im ESR-Spektrum ein signifikantes Signal zeigen, das auf die Anwesenheit eines Matrix-assoziierten Radikals hinweist (Beck-Speier et al., 2002). Darüber hinaus konnten die Autoren nachweisen, dass uf-EC-Partikel ein oxidatives Potential gegenüber der Aminosäure Methionin besitzen, indem diese zu Methioninsulfoxid oxidiert wird. In zellulären Studien zeigte sich des Weiteren, dass uf-EC-Partikel die Lipidperoxidation induzieren. Untersuchungen am Institut für Gefahrstoff-Forschung (IGF, Bochum) über den Gehalt an organischen Komponenten mittels coulometrischer Verfahren (Chow et al., 2001; Hebisch et al., 2003) ergaben einen circa 6 %igen Gehalt an Kohlenwasserstoffen auf den uf-EC-

Partikeln. Eine anorganische Analyse zeigte einen extrem geringen Gehalt an metallischen Verunreinigungen.

*Ultrafeine EC-Partikel zeigen ein signifikantes ERS-Signal, besitzen ein hohes oxidatives Potential und weisen einen organischen Kohlenwasserstoffgehalt von circa 6 % auf.*

## 3.3 Zellmodell

### 3.3.1 Zielzellen im Alveolarbereich

Bei jedem Atemzug gelangen mit der Luft erhebliche Mengen partikulärer Substanzen in unsere Lunge. Ein Teil der inhalierten Partikel wird in Abhängigkeit von der Partikelgröße, der Atemzugtiefe und der Geschwindigkeit des Volumenstroms in unterschiedlichen Teilen der Atemwege deponiert. Ultrafeine Partikel gelangen bis in die Lungenperipherie und deponieren bevorzugt auf der alveolären Epithelschicht. Sie haben dort die Möglichkeit, mit epithelialen Zellen zu interagieren, in das Interstitium einzuwandern oder aber von Alveolarmakrophagen aufgenommen zu werden. Da bisher wenig über die Funktion des Alveolarepithels an der Reaktion auf partikuläre Verunreinigungen der Atemluft bekannt ist, wurde in dieser Studie ein *in-vitro*-Modell etabliert, um die Deposition von luftgetragenen ultrafeinen Partikeln auf alveoläre Epithelzellen der menschlichen Lunge nachzuahmen.

Alveoläre Typ-I-Epithelzellen bilden *in-vivo* eine Barriere zum Blutkreislauf. Diese sehr empfindlichen Zellen, die bislang nicht aus humanem Lungengewebe isolierbar sind, können bei Verletzung *in-vivo* durch sich differenzierende Typ-II-Zellen, ersetzt werden. Letztere stehen auch als immortalisierte Zelllinien aus verschiedenen Organismen zur Verfügung. Die in dieser Studie verwendeten Zellen sind dem humanen Alveolarepithel zuzuordnen und nicht dem Bronchialepithel wie die meisten anderen Zelllinien.

Für die Etablierung des Systems wurden humane alveoläre Typ-II-Zellen (A549) verwendet. Der Vorteil einer solchen Zelllinie besteht darin, dass über lange Zeit hinweg dasselbe Zellmaterial in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Diese Kontinuität ist in einem neuen System, das viele variable Parameter beinhaltet, besonders wichtig. Da sich aus diesen Zellen größere Mengen an m-RNA isolieren lassen, sind sie für Screeningversuche mit

der c-DNA-Array-Technik besonders gut geeignet. Auch sind A549-Zellen in der Lage, Partikel unterschiedlicher Beschaffenheit zu phagozytieren (Foster et al., 2001; Stringer et al., 1996). Ein Nachteil ist, dass sie nicht zwangsläufig den primären Zellen entsprechen, von denen sie abstammen. Durch die Immortalisierung der Zellen können wichtige Funktionen modifiziert oder vollständig aufgehoben worden sein. Aus diesem Grund sollten Aussagen, die auf Untersuchungen mit A549-Zellen basieren, mit Primärzellen verifiziert werden. Da dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich war, ist es ein vorrangiges Ziel zukünftiger Studien, den Einfluss von uf-EC-Partikeln auf die Genexpression von primären Epithelzellen zu untersuchen.

*Alveoläre Epithelzellen sind ein bevorzugtes Target für luftgetragene uf-Partikel. Für die Expositionsstudien wurde daher die alveoläre Zelllinie A549 als Modell für alveoläre Epithelzellen verwendet.*

### **3.4 Integrität der Monolage**

Auf Anodisk-Membranen ausgesäte A549-Zellen wurden nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop auf optische und mit Hilfe des spezifischen transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) auf funktionelle Integrität der Zellschicht untersucht. Aus dem Kapitel 2.6.2 wird deutlich, dass nach Kultivierung der A549-Zellen auf Anodisk-Membranen für zehn Tage noch keine komplette optische Integrität der Zellschicht erreicht werden konnte. Bei Kultivierungszeiten von zehn Tagen und mehr wachsen die Zellen auf der Membran zunehmend mehrschichtig.

Um einen mehrlagigen Zellrasen möglichst zu vermeiden, wurden die Zellen für die Expositionen an der LMG für neun Tage auf den Membranen kultiviert. Primäres Ziel der vorliegenden Studie war es, die Beeinflussung der Genexpression durch uf-Partikel zu analysieren. Die Existenz eines weitestgehend als Monolage vorliegenden Zellrasens war daher von höherer Priorität als die Bildung eines dichten Zellrasens mit zunehmendem Anteil mehrlagiger Zellschichten. Nach Färbung des Occludins wurde deutlich, dass A549-Zellen Tight-Junctions ausbilden und auf diese Weise eine Kommunikation zwischen den Zellen stattfinden kann, auch wenn die Zellbarriere an manchen Stellen auf der großen Fläche der Anodisk-Membranen nicht komplett dicht war.

Primäre humane Epithelzellen erreichen als dichte Monolage TEERs von über  $1.000 \Omega\text{cm}^2$  (Fuchs et al., 2003). Auf kleinen Membranen mit 12 mm Durchmesser kann nach sehr dichtem Aussäen der A549-Zellen und Kultivierung für sechs Tage ein TEER von  $764 \Omega\text{cm}^2$  auftreten (Kobayashi et al., 1995). In der vorliegenden Studie konnte zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung des TEER gemessen werden (siehe auch Kapitel 5.8, Seite 124). Für die Ausbildung einer funktionellen Integrität sind die Anodisk-Membranen mit einem Durchmesser von 47 mm zu groß, als dass die Entstehung einer komplett konfluenten Zellschicht möglich wäre.

Für zukünftige Studien wird das Expositionssystem auf Membranfiltern mit kleinerem Durchmesser adaptiert, um die Kultivierung von Epithelzellen zu einer optimalen konfluenten Monolage zu gewährleisten, die einen deutlich erhöhten TEER aufweist.

*Die für die Studien eingesetzten Kulturen lagen weitgehend als konfluente Monolage vor, die nach histochemischen Untersuchungen Tight-Junctions ausgebildet hatten, jedoch keinen erhöhten spezifischen transepithelialen elektrischen Widerstand aufwiesen.*

### 3.5 Viabilität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Viabilität der A549-Zellen nach 6 h Exposition an der LMG ohne und mit Partikelexposition mit zwei Methoden gemessen. Zum einen wurde der Anteil der geschädigten Zellen nach Inkorporation des Farbstoffs Trypanblau ermittelt. Zum anderen wurde die Abnahme der Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST1 durch mitochondrielle Dehydrogenasen zu wasserlöslichem Formazan als Kriterium einer verminderten Viabilität verwendet. Dieses Prinzip wurde bisher von mehreren Gruppen zur Bestimmung der Viabilität genutzt (Aufderheide et al., 1999; Chou et al., 2003; Pan and Loo, 2000; Toimela and Tahti, 2001) und auch mit anderen Methoden (LDH Gehalt, Comet-Test) verifiziert. Die Viabilitätsbestimmung mit Hilfe des WST1-Tests sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da die Reduktion des Tetrazoliumsalzes auch durch das Superoxid-Anion erfolgen kann und z.B. zur Bestimmung der Respiratory-Burst-Aktivität von Neutrophilen genutzt wird (Tan and Berridge, 2000; Ukeda et al., 2002). Hier bedeutet eine Zunahme der Reduktion des WST1-Farbstoffs eine vermehrte Bildung von Superoxid-Anion.

Im Vergleich mit den submers kultivierten Zellen wurde bei den Kontrollzellen an der LMG eine um 7 % reduzierte und bei den mit EC-Partikeln exponierten Zellen an der LMG



eine um 5 % reduzierte Viabilität detektiert. Ob der Farbstoff in den Mitochondrien oder an den Zellmembranen durch das Superoxid-Anion reduziert wurde, ist mit diesen Ergebnissen nicht zu klären. Da jedoch die Zellen in den Expositionskammern eine niedrigere Viabilität aufweisen und hier der Stress der Zellen im Vergleich zu den submersen Kulturen eher erhöht ist (erhöhte Expression von HSPA6 und HO1), deutet dies eher auf eine verminderte mitochondrielle Aktivität hin. Dies bestätigte auch der Trypanblau-Test, bei dem Kontrollzellen aus der Expositionskammer eine um 4 % verringerte Viabilität und Partikel-exponierte Zellen aus der Expositionskammer eine um 7 % verringerte Viabilität im Vergleich zur Viabilität submerser Kulturen aufwiesen. Effekte durch die Exposition, die auf der Genexpressionsebene festgestellt werden, sind daher nicht auf eine große Anzahl sterbender Zellen zurückzuführen.

*Die Viabilität von Zellkulturen nach Exposition an der LMG war gegenüber den submersen Kontrollen nur geringgradig, aber signifikant erniedrigt. Die Exposition mit EC-Partikeln hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die Zellviabilität.*

### **3.6 Genexpressions-Array**

Die Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit eines breiten Screenings der Expression von mehreren Tausend Genen in einem Ansatz. Die Produktpalette reicht von c-DNA-Arrays auf Nylonmembranen (z.B. Clontech-Atlas-Array) mit wenigen Hundert bis mehreren Tausend Genen, wobei die Detektion meist mit radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$  erfolgt, über Plastikchips bis hin zu Glaschips (z.B. GeneChips von Affymetrix), die meist mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Bei den Letzteren können Genexpressionsänderungen über den Bereich eines ganzen Genoms einer Spezies auf zwei oder drei Chips untersucht werden. Die ersten Microarrays auf Glaschips wurden 1995 entwickelt (Skena et al., 1995). Partikelwirkungen von beladenen Umweltpartikeln und Dieselruß auf Genexpressionen in Targetzellen der Lunge wurden mit der Array-Technik bislang vornehmlich in monozytären Zellen beschrieben. 1999 wurde die Wirkung von DEP in Ratten nach Langzeitexposition mit Microarrays gescreent (Sato et al., 1999). Auch die Wirkung von Tabakrauch auf periphere mononukleäre Zellen in humanem Blut (Ryder et al., 2004) oder von DEP auf eine humane Makrophagen-Zelllinie (Verheyen et al., 2004) wurden mittels der Array-Technik untersucht.

Die vorliegende Arbeit befasste sich nun mit der Wirkung von Modell-Partikeln aus elementarem Kohlenstoff (EC-Partikel) auf Genexpressionen in Zellen des Alveolarepithels. Dazu wurden sowohl ein Clontech-Array (Atlas-Human-1.2) sowie Affymetrix-GeneChips (HG-U133A) eingesetzt. Eine ausführliche Auflistung der über die Arrays ermittelten regulierten Gene und deren vollständige Bezeichnung ist im Anhang dieser Dissertation zu finden.

#### **3.6.1 Clontech-Atlas-Array**

Der Clontech-Atlas-Human-1.2-Nylon-Array wurde in der vorliegenden Studie als Pilotexperiment nach einer MID-DOSE-Exposition ( $287 \text{ ng/cm}^2$ ,  $2,9 \times 10^8 \text{ Partikel/cm}^2$ ) von A549-Zellen angewendet.

##### **3.6.1.1 Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array**

Einige Gene zeigten nach EC-Exposition der A549-Zellen an der LMG eine deutlich verstärkte Expression. Die Expressionsänderungen dieser Gene (z.B. CASP10, FRA1, HPI31, IEX-1L, ITGB1, ITGB4, PRKAR1B, rhoB und TIMP1) sind im Anhang abgedruckt. Der Effekt von TNF auf A549-Zellen an der LMG war für MCP1, IL8, GCP2, ITGB1 und CASP10 in der Kombination mit EC-Partikeln (EC + TNF) verstärkt.

Die Analyse des Clontech-Array ergab eine Hochregulierung der FRA1-Transkription durch EC-Partikel auf das 1,7-fache. Das FRA1-Protein gehört zur AP-1-Familie und bildet sehr stabile Heterodimere mit anderen Komponenten dieser Familie, wie den Jun-Proteinen. Der Transkriptionsfaktor AP-1 spielt neben NfκB bei Zellantworten auf Stress (z.B. oxidativen Stress) eine zentrale Rolle (Stone et al., 2000). In einer kürzlich durchgeführten Studie (Zhang et al., 2004) wurde die Aktivierung von FRA1 durch DEP in einer Epithelzelllinie der Maus gezeigt. Die DEP-induzierte FRA1-Expression konnte durch ERK1/2-, JNK1- und p38-MAPKs-Inhibitoren unterdrückt werden, was eine Beteiligung dieser Signalwege an der durch Partikel induzierten Wirkung nahelegt.

Die Expression von PRKAR1B als einer Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) war nach EC-Exposition 15-fach erhöht. Hier deutet sich ebenfalls

eine Interaktion der EC-Partikel mit einer Phosphorylierungskaskade in der Signaltransduktion an.

Nach EC-Exposition und EC-Exposition mit anschließender TNF-Stimulation war auch eine erhöhte Genexpression des Integrin beta1 (ITGB1) erkennbar. Die Integrin-Familie besteht aus Proteinen, die als alpha- und beta-Untereinheiten Heterodimere bilden, die an Zell-Matrix- und an Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt sind.

Die Expression der Caspase 10 (CASP10), auch als FLICE2 (Fas-associated death domain protein interleukin 1beta-converting enzyme 2) bezeichnet, war nach EC-Exposition ebenfalls erhöht. Auch trat eine erhöhte TNF-induzierte CASP10-Expression in Kombination mit EC-Partikeln auf. CASP10 ist an der Apoptose von Zellen und an Signaltransduktionen über CD95 und p55 beteiligt (Vincenz and Dixit, 1997).

Bei den drei Chemokinen, MCP1, IL8 und GCP2, konnte eine schwache Erhöhung der TNF-induzierten Expression nach EC-Exposition beobachtet werden. MCP1 ist ein Chemokin und kann potent Basophile aktivieren; es wirkt chemotaktisch auf Monozyten, nicht jedoch auf Neutrophile (Leonard et al., 1991). MCP1 ist *in-vivo* bei Entzündungen, die mit Leukozyteninfiltration einhergehen, erhöht (Proost et al., 1996). Eine Erhöhung der MCP1-Transkription durch die EC-Exposition würde somit eine Verstärkung der proinflammatorischen Reaktion nach Stimulation der Zellen mit TNF bedeuten. Im Gegensatz dazu ist nach alleiniger Exposition mit EC-Partikeln (ohne TNF-Nachstimulation) kein proinflammatorischer Effekt zu erkennen; hier ist die MCP1-Expression leicht vermindert (siehe Tab. 27 im Anhang). Die gleichen Tendenzen zeigen sich für ein weiteres Chemokin, dem IL8. Im Gegensatz zu MCP1 aktiviert IL8 Neutrophile (Harada et al., 1994). Ein weiterer Aktivator, der den gleichen Rezeptor wie IL8 zur Aktivierung von Neutrophilen nutzt (Strieter et al., 1992), ist das GCP2 oder ENA-78 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78). Auch bei diesem Gen war der proinflammatorischen Effekt durch TNF in Kombination mit EC-Partikeln verstärkt. Die leicht Hochregulierung der Transkripte von MCP1, IL8 und GCP2 nach EC-Exposition und Nachinkubation mit TNF (EC + TNF) im Vergleich zu TNF alleine deuten auf eine Verstärkung der proinflammatorischen Antwort der Zellen auf TNF nach EC-Exposition hin.

*Die Transkript-Analyse einer MID-DOSE-Exposition mittels des Clontech-Arrays ergab veränderte Expressionen von Chemokinen und Genen aus der Signaltransduktion bzw. Apoptose (FRA1, CASP10).*

### 3.6.1.2 Verifikation von Daten aus dem Clontech-Array mittels LC-PCR

Die im Clontech-Array gefundenen Kandidatengene wurden mit Hilfe der LC-PCR überprüft. Expressionserhöhungen nach der Exposition mit EC-Partikeln (EC) oder der Exposition mit EC-Partikeln und folgender Stimulation mit TNF (EC + TNF) konnten für die in Tab. 18 gezeigten Gene bestätigt werden.

Für die Gene PRKAR1B und ITGB1 ließen sich die Ergebnisse mittels LC-PCR mit RNA aus derselben Exposition nicht verifizieren. Leider konnten mit m-RNA-Präparationen aus weiteren Expositionsexperimenten die mit dem Clontech-Array identifizierten und mit LC-PCR verifizierten Gene nicht bestätigt werden.

Tab. 18. Verifikation der Clontech-Array-Tendenzen mittels LC-PCR, erhöhte oder verminderte Expression nach EC-Exposition (EC) oder EC-Exposition und TNF-Stimulation (EC + TNF) gegen die entsprechende Kontrolle.

Gen	EC versus Kontrolle		(EC + TNF) versus TNF	
	Clontech-Array	LC-PCR	Clontech-Array	LC-PCR
FRA1	↑	↑	↓	-
CASP10	↑	-	↑	↑
MCP1	-	-	↑	↑
IL8	↓	-	↑	↑
GCP2	-	↑	↑	↑

*Mit der aus weiteren MID-DOSE-Expositionsexperimenten isolierten m-RNA konnten die mit dem Clontech-Array identifizierten und mit LC-PCR verifizierten Gene nicht bestätigt werden.*

### 3.6.2 Affymetrix-GeneChips

Während die m-RNA aus Zellen nach einer MID-DOSE-Exposition mit Hilfe der Clontech-Arrays analysiert wurde, erfolgten die Transkript-Analysen nach LOW-DOSE- und HIGH-DOSE-Expositionen mittels der Affymetrix-HG-U133A-GeneChips. Für die Arrays wurde hierzu das Zellmaterial aus je drei Kammerversuchen gepoolt, während für die Verifikation mittels LC-PCR die aus den einzelnen Ansätzen isolierten m-RNA-Proben

verwendet wurden. Für die erste Serie von GeneChips wurde m-RNA aus Zellen aus LOW-DOSE-Expositionen eingesetzt, die mit durchschnittlich 95 ng Partikel/cm<sup>2</sup> und 1,8 x 10<sup>8</sup> Partikel/cm<sup>2</sup> Membranfläche belastet worden waren (n = 3, berechnet aus Tab. 7). Mit der zweite Serie von GeneChips wurden Proben nach HIGH-DOSE-Expositionen mit einer durchschnittlichen Deposition von 539 ng Partikel/cm<sup>2</sup> und 4,3 x 10<sup>8</sup> Partikel/cm<sup>2</sup> analysiert (n = 3, berechnet aus Tab. 9).

### **3.6.2.1 Stark und schwach regulierte Gene**

Gemäß der Affymetrix-Definition (siehe Kapitel 5.10.2.7) war auf den LOW-DOSE-GeneChips das PIG11-Gen nach EC-Exposition bzw. das HSPA6-Gen nach EC-Exposition und nachfolgender Stimulation mit TNF (EC + TNF) stark reguliert. Schwach reguliert waren dagegen unter anderem die Gene PLXNC1, TRPC6, MCJ, TLE1, ZNF144 und MUC5B nach EC-Exposition, sowie PLA2G2 und USP7 nach EC-Exposition in Kombination mit TNF.

Auf den HIGH-DOSE-GeneChips waren die Gene ABHD2 und KIAA0870 nach Exposition mit EC-Partikeln und Stimulation mit TNF stark reguliert. Andere Gene wie PTPRN und FLJ10665 waren nach EC-Exposition in Kombination mit TNF schwach reguliert. Nach alleiniger Exposition mit EC-Partikeln konnten auf dem HIGH-DOSE-GeneChip nur schwach regulierte Gene z.B. DC12, BIRC5, KIAA0186 und RPS11 identifiziert werden.

Ein Vergleich zwischen den Expressionsänderungen bei LOW-DOSE- und bei HIGH-DOSE-Expositionen der erwähnten Gene sind im Anhang dieser Dissertation aufgelistet.

*Mit Hilfe der Affymetrix-GeneChip-Analyse von m-RNA aus Expositionen an der LMG unter LOW- und HIGH-DOSE-Bedingungen konnten mehrere stark oder schwach regulierte Kandidatengene identifiziert werden.*

### **3.6.2.2 Stressproteine**

Ein an der Antwort auf Partikelexposition beteiligtes, durch die Array-Analysen identifiziertes Gen für ein Stressprotein, ist das HeatShock-Protein 70 B` (HSPA6). Seine Rolle in der Zelle nach Partikelexposition wird im Kapitel 3.7.5 ausführlich diskutiert. Die in

den LOW-DOSE-Affymetrix-GeneChips auftretenden Änderungen der Expression dieses Genes konnten mittels LightCycler-Analytik bestätigt werden (siehe Abb. 27).

#### **3.6.2.3 p53-beeinflussende Faktoren**

Proteine, die in den p53-Weg eingreifen, sind das USP7 (Li et al., 2002a) und das PIG11 (Liang et al., 2003). Die USP7-Expression war bei der LOW-DOSE-Exposition (+ 74 %) und bei der HIGH-DOSE-Exposition (+ 71 %) im GeneChip verstärkt. Bei PIG11 handelte es sich auf dem LOW-DOSE-GeneChip um ein stark reguliertes Gen, dessen Expression hochreguliert war (Faktor 5,3).

Ein durch EC-Partikel nach HIGH-DOSE-Exposition hochreguliertes Gen, ist das BIRC5 oder Survivin. BIRC5 ist ein Apoptose-Inhibitor der IAP- Familie und bildet mit HSP90 Komplexe. In diesem Zustand kann es seine antiapoptotische Wirkung entfalten (Fortugno et al., 2003).

#### **3.6.2.4 Transkription**

Das MCJ-Gen wurde auf den LOW-DOSE-GeneChips nach EC-Exposition als vermehrt exprimiert detektiert. MCJ enthält Domänen von DNAJ (HSP40) und kann Zinkfingerstrukturen ausbilden. Die J-Domäne kann mit der ATPase-Domäne von HSP70 interagieren und deren Aktivität stimulieren (Gething and Sambrook, 1992; Hohfeld et al., 1995; Rothman, 1989).

Weiterhin war in den beiden untersuchten Dosisbereichen die Expression von ZNF144 durch EC-Partikel hochreguliert. Eine leichte Abnahme der TNF-induzierten Expression in Kombination mit EC-Partikeln, im Vergleich zur Stimulation mit TNF alleine, war bei LOW-DOSE-Expositionen zu finden. Zinkfingerproteine (ZNF) gehören zu den „Gen-anschaltenden“ Transkriptionsfaktoren.

Das TLE1-Gen wurde auf den LOW-DOSE-GeneChips nach EC-Exposition als vermehrt exprimiert detektiert. TLE1 (transducin-like enhancer of split 1) ist an der Transkriptionsregulierung beteiligt und ist für den undifferenzierten Status von immortalisierten Epithelzellen mitverantwortlich (Liu et al., 1996).

### **3.6.2.5 Lipidstoffwechsel**

Das PLA2G2 ist eine Phospholipase A2, deren Expression auf dem LOW-DOSE-GeneChip nach EC-Exposition und in Kombination mit TNF-Stimulation unterdrückt war.

### **3.6.2.6 Rezeptoren**

Das TRPC6-Gen (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6) codiert für einen DAG (Diacylglycerol)-abhängigen Calcium-Rezeptor (Nilius et al., 2003). Auf dem HIGH-DOSE-GeneChip war seine Expression durch EC-Partikel erhöht. Die Expression der transmembranären Tyrosinphosphatase PTPRN war auf den LOW-DOSE- und den HIGH-DOSE-GeneChips nach EC-Exposition vermindert.

Plexine (PLXN) gehören zu der Familie der Transmembranmoleküle, deren extrazelluläre Domäne mit Semaphorinen interagiert. PLXNC1 ist ein Rezeptor für das GPI-verankerte Semaphorin Sema7A (Tamagnone et al., 1999). Die Funktion von Plexin-Semaphorin-Komplexen wurde meist bei der Entwicklung von Neuronen beschrieben, jedoch wurde mit dem humanen CD100 ein Semaphorin gefunden, das z.B. auf Monozyten und Granulozyten zu finden ist (Bougeret et al., 1992; Hall et al., 1996).

DC12 (sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha) ist ein Natriumionenkanal, dessen Expression auf den HIGH-DOSE-GeneChips nach EC-Exposition erhöht war. Dieser Ionenkanal könnte bei der Vermittlung der EC-Effekte eine wichtige Rolle spielen.

### **3.6.2.7 Proteine mit unbekannter Funktion**

Ein Gen, das für ein Protein codiert, dessen Funktion nicht bekannt ist, ist das KIAA0186-Gen. Die KIAA0186-Transkriptmenge wurde auf dem HIGH-DOSE-GeneChip durch EC-Exposition erhöht.

### **3.6.2.8 Verifikation von Daten aus den Affymetrix-GeneChips mittels LC-PCR**

Zur Verifikation der Ergebnisse aus den Affymetrix-GeneChips mit der LC-PCR wurde für die aufgeführten Gene die m-RNA aus den jeweils drei Einzelexperimenten separat

analysiert. Die Gene, bei denen in den GeneChip-Analysen Änderungen gefunden wurden und die in der LC-PCR bestätigt werden konnten, sind in Tab. 19 gezeigt.

LC-Untersuchungen mit m-RNA-Proben aus anderen Expositionsexperimenten, als den für die GeneChips verwendeten, fanden für die hier genannten Gene mit Ausnahme der HSPA6-Gens im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht statt. Die HSPA6-Expressionen wurden dagegen bei allen durchgeführten Expositionen untersucht. Die GeneChip-Daten der Gene ABHD2, FLJ10665, KIAA0870, MCJ, MUC5B, PIG11, PTPRN, RPS11, TLE1 und USP7 konnten mit der LC-PCR nicht bestätigt werden.

Tab. 19. Verifikation der GeneChip-Tendenzen mittels LC-PCR, erhöhte oder verminderte Expression nach EC-Exposition (EC) oder EC-Exposition und TNF-Stimulation (EC + TNF) gegen die entsprechende Kontrolle.

Gen	Dosisbereich	EC versus Kontrolle		(EC + TNF) versus TNF	
		GeneChip	LC-PCR	GeneChip	LC-PCR
HSPA6	LOW-DOSE	-	-	↓	↓
PLA2G2	LOW-DOSE	↓	↓	↓	↓
PLXNC1	LOW-DOSE	↑	↓	↓	↓
TRPC6	LOW-DOSE	↑	↓	↓	↓
ZNF144	LOW-DOSE	↑	↓	↓	↓
BIRC5	HIGH-DOSE	↑	↑	↑	-
DC12	HIGH-DOSE	↑	↑	↑	↑
KIAA0186	HIGH-DOSE	↑	↑	↓	-

*Von den mittels Affymetrix-GeneChip identifizierten Kandidatengenen ließen sich 44 % der Gene in ihrer Tendenz zu einer veränderten Expression mittels LC-PCR-Analyse bestätigen.*

### 3.7 Kultivierungs- und Partikel-bedingte Stressreaktionen

Die vorangegangenen Untersuchungen über Änderungen der Genexpression durch Partikelexposition zeigen, dass auf den Expressionsarrays bei einigen Genen deutliche Veränderungen erkennbar waren (Verstärkung oder Abschwächung der Expression durch Partikel alleine oder mit einer TNF-Nachstimulation). Die Tendenzen konnten jedoch bei 56 % der Gene mittels LC-PCR nicht bestätigt werden.



Im Gegensatz dazu zeigte das HSPA6 nach LOW-DOSE-Expositionen deutliche Reaktionen auf den Affymetrix-GeneChips, die durch LC-PCR bestätigt werden konnten. Bei den HIGH-DOSE-Expositionen waren auf den GeneChips keine Veränderungen aufgetreten, es zeigten sich jedoch deutliche Effekte in der LC-PCR. Für die MID-DOSE-Exposition, die als Pilotexperiment für eine Analyse mit dem Clontech-Array durchgeführt wurde, liegt dagegen kein Ergebnis vor, weil sich auf diesem Array keine Sonde für HSPA6 befand.

Da mit dem HSPA6 ein hochempfindlicher Indikator für zelluläre Stressreaktionen identifiziert worden war, wurden zusätzliche Expositionen an der LMG in den drei Dosisbereichen und zusätzliche submersen Expositionen für Untersuchungen mittels LC-PCR durchgeführt. Gleichzeitig wurde die HO1 (= HSP32), ein Enzym, das ebenfalls zur Klasse der HeatShock-Proteine gehört und sensitiv auf oxidativen Stress reagiert, in diese Untersuchungen mit einbezogen.

Mit Hilfe dieser beider Proteine sollte, (1) die Stressbelastung nach Kultivierung von Zellen an der LMG im Vergleich zu submers kultivierten Zellen abgeschätzt und (2) eine potentiell unterschiedliche Stresssensitivität der Zellen in submersen Kulturen und LMG-Kulturen auf die Exposition mit Partikeln identifiziert werden. Da zelluläre Stressreaktionen häufig im Rahmen von Entzündungsprozessen auftreten, wurde auch die Expression der inflammatorischen Zytokine IL6 und IL8 beobachtet.

*Zur Charakterisierung der Stressantwort auf veränderte Kulturbedingungen und Partikel-induzierte Stressreaktionen wurden entsprechend den ersten biologischen Befunden dieser Arbeit die HeatShock-Proteine HSPA6 und HO1 verwendet. Ergänzend wurden zwei inflammatorische Zytokine (IL6 und IL8) in diese Untersuchungen mit einbezogen.*

### **3.7.1 Stressreaktionen nach Kultivierung von A549-Zellen an der Luft-Medium-Grenzschicht in Abwesenheit von Partikeln**

Kulturen von A549-Zellen, die an der LMG im Expositionssystem einem Luftstrom von 250 ml/min ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich zu submersen Kulturen als Kontrolle einen signifikanten Anstieg der Transkriptionsrate der vier untersuchten Gene (IL8, IL6, HSPA6 und HO1, siehe Kapitel 2.10.1).

Die Erhöhung lag für IL8 und IL6 deutlich unter derjenigen von submersen Kulturen nach Stimulation mit TNF (TNF sub, Tab. 20). Der Anstieg der IL8- und IL6-Transkripte

nach TNF-Stimulation der Zellen an der LMG war vergleichbar mit demjenigen bei submersen Zellen. Für HSPA6 und HO1 hingegen zeigte ein Vergleich der an der LMG kultivierten Zellen sowohl ohne (Kontrolle-LMG) als auch mit anschließender TNF-Stimulation (TNF-LMG) eine vergleichbare stark erhöhte Bildung der Transkripte (Tab. 20). Dieser Anstieg der HeatShock-Protein-Transkripte kann als eine deutliche Stressreaktion der Zellen an der LMG interpretiert werden. Sowohl HSPA6 als auch HO1 stellen demnach sensible Indikatoren für veränderte *in-vitro*-Kulturbedingungen dar, die denen in der peripheren Lunge ähneln.

Tab. 20. Genexpressionsänderungen nach verschiedenen Kultivierungsarten, ohne bzw. nach Stimulation mit TNF für IL8, IL6, HSPA6 und HO1 bezogen auf die Kontrolle submers. 0, nicht reguliert; +, 2 bis 9-fach hochreguliert; ++, 10 bis 19-fach hochreguliert; +++, 20 bis 29-fach hochreguliert; +++++, über 30-fach hochreguliert. sub, submerse Kultivierung; LMG, Kultivierung an der LMG.

Gen	Kontrolle sub	TNF sub	Kontrolle- LMG	TNF- LMG
IL8	0	++	+	++
IL6	0	+++	+	+++
HSPA6	0	0	+++	++++
HO1	0	0	+	+

### 3.7.2 Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln unter submersen Bedingungen

Unter submersen Bedingungen zeigten die A549-Zellen bei Exposition mit steigenden Konzentrationen der EC-Partikel eine vermehrte IL8-Transkription und verminderte HO1-Transkription.

Die Transkriptmenge für IL6 und HSPA6 hingegen war nach einer mittleren Dosis der EC-Partikel (10 µg/ml) maximal erhöht, wobei dieser Effekt bei der hohen EC-Konzentration (100 µg/ml) wieder auf oder unter den Kontrollwert zurück ging (Tab. 21). Bei HSPA6 und HO1 trat unter submersen Bedingungen eine Unterdrückung der TNF-induzierten Expression durch die Exposition mit EC-Partikeln auf. Sie war in allen Dosisbereichen vorhanden und war beim HSPA6 am deutlichsten bei der niedrigen Dosis der EC-Partikel zu sehen. Beim proinflammatorischen Zytokin IL8 war die TNF-induzierte Expression durch die hohe Dosis EC-Partikel unterdrückt (Tab. 21).

Tab. 21. Genexpressionsänderungen nach submerser Exposition mit uf-EC-Partikeln ohne bzw. nach Stimulation mit TNF für IL8, IL6, HSPA6 und HO1 bezogen auf die Kontrolle (für EC) oder auf TNF (für EC + TNF). --, unter 0,4-fach reguliert; -, 0,4 bis 0,7-fach reguliert; 0, 0,8 bis 1,4-fach reguliert; +, 1,5 bis 2,4-fach hochreguliert; ++, 2,5 bis 3,4-fach hochreguliert; +++, über 3,5-fach hochreguliert.

Gen	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
	EC	EC	EC	EC + TNF	EC + TNF	EC + TNF
IL8	0	+	+++	0	0	-
IL6	+	+++	0	0	0	0
HSPA6	-	+++	-	--	-	-
HO1	0	0	-	-	-	-

*Die bei den submersen Expositionen erhaltenen Werte schwankten stark. Eine plausible Erklärung dafür ist die unterschiedliche Verfügbarkeit der Partikel im Kulturmedium nach ihrer Suspendierung und der damit einhergehenden Agglomeration im wässrigen Milieu. Auf die Exposition mit mittlerer EC-Dosis reagierten sowohl die beiden Zytokine als auch die beiden HeatShock-Proteine unterschiedlich.*

### **3.7.3 Stressreaktion nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht**

Die beobachteten Stressreaktionen der A549-Zellen nach Exposition mit niedrigen, mittleren und hohen Dosen an EC-Partikeln an der LMG sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL8 und IL6 und des HeatShock-Proteins HO1 war bei der Exposition von A549-Zellen mit uf-EC-Partikeln an der LMG bei niedrigen und mittleren Dosen erhöht (Tab. 22). Bei den MID-DOSE-Expositionen war auch das HSPA6-Transkript stark erhöht, während es mit niedrigen und hohen EC-Dosen unter dem Kontrolllevel lag.

EC-Expositionen mit niedrigen und hohen Dosen verminderten die durch TNF stimulierbare HSPA6-Transkriptmenge, während dies bei HO1 nur für die hohe EC-Dosis zutraf. Im Gegensatz dazu waren die Transkriptmengen von HSPA6 und HO1 bei EC-Expositionen mit der mittleren Dosis und nachfolgender TNF-Stimulation im Vergleich zur TNF-Kontrolle stark erhöht.

Tab. 22. Genexpressionsänderungen nach der Exposition mit uf-EC-Partikeln an der LMG ohne bzw. nach Stimulation mit TNF für IL8, IL6, HSPA6 und HO1 bezogen auf die Kontrolle-LMG (für EC) oder auf TNF-LMG (für EC + TNF). --, unter 0,4-fach reguliert; -, 0,4 bis 0,7-fach reguliert; 0, 0,8 bis 1,4-fach reguliert; +, 1,5 bis 2,4-fach hochreguliert; ++, 2,5 bis 3,4-fach hochreguliert; +++, über 3,5-fach hochreguliert. LOW-DOSE, 90 ng/cm<sup>2</sup>; MID-DOSE, 196 ng/cm<sup>2</sup>; HIGH-DOSE, 470 ng/cm<sup>2</sup>.

Gen	LOW-DOSE- EC	MID-DOSE- EC	HIGH-DOSE- EC	LOW-DOSE- (EC + TNF)	MID-DOSE- (EC + TNF)	HIGH-DOSE- (EC + TNF)
IL8	+	+	0	0	+	0
IL6	+	++	-	0	0	0
HSPA6	-	+++ <sup>1</sup>	- <sup>2</sup>	-- <sup>2</sup>	+++ <sup>3</sup>	- <sup>1</sup>
HO1	+	+ <sup>2</sup>	0	+	+++ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>

*Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die A549-Epithelzellen bei den Expositionen mit uf-EC-Partikeln an der LMG äußerst empfindlich auf die eingesetzte Partikeldosis durch eine Expressionsänderung der HeatShock-Proteine HSPA6 und HO1 reagierten. Während bei mittleren Dosen eine stark vermehrte Transkriptmenge induziert wurde, fand bei höheren Dosen eine Abnahme der Expression auf oder unter den Kontrollwert statt.*

### **3.7.4 Vergleich der Stressreaktionen nach Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikel unter submersen Bedingungen und an der Luft-Medium-Grenzschicht**

Der Übergang von der niedrigen zur mittleren EC-Dosis bewirkte eine stark zunehmende Genexpression des HSPA6 bei submersen Expositionen wie auch bei Expositionen an der LMG. Dies bedeutet eine Aktivierung von zytoprotektiven Mechanismen in den A549-Zellen. Die HO1-Expression betreffend wurde eine erhöhte spezifische Transkriptmenge mit der mittleren EC-Dosis bei der Exposition an der LMG beobachtet, jedoch nicht unter submersen Expositionsbedingungen. Beck-Speier et al. (2002) konnten nachweisen, dass uf-EC-Partikel in frisch hergestellten Suspensionen in der Lage sind, die

<sup>1</sup> p ≤ 0,05

<sup>2</sup> p ≤ 0,01

<sup>3</sup> p ≤ 0,05 (SR-Test)

Aminosäure Methionin zu Methioninsulfoxid zu oxidieren. Diese Fähigkeit geht nach einer mehrstündigen Inkubation der wässrigen Suspension im Vergleich zur frisch hergestellten Suspension drastisch zurück. Eine Verminderung des oxidativen Potentials der Partikel könnte auch bei den submersen Expositionen eine Rolle spielen und damit die fehlende Erhöhung der HO1-Expression erklären.

*Die A549-Zellen nach submerser Exposition bzw. nach Exposition an der LMG verhielten sich sehr ähnlich, indem sie eine starke dosisabhängige Regulation der HSPA6-Transkriptmenge zeigten. Die HO1-Expression war dagegen nur an der LMG einer stark dosisabhängigen Regulation unterworfen.*

Ein Vergleich der Effekte bei submers und an der LMG exponierten A549-Zellen ergibt gravierende Unterschiede in den Dosis-Wirkungsbeziehungen. Bei submersen Inkubationen wurden 0,3 bis 30  $\mu\text{g}$  EC-Partikel/ $\text{cm}^2$  für die Expositionen eingesetzt. Für die Expositionen an der LMG wurden im Mittel 0,1 bis 0,5  $\mu\text{g}$  EC-Partikel/ $\text{cm}^2$  Filterfläche deponiert ( $1,7 \times 10^8$  bis  $4,7 \times 10^8$  Partikel/ $\text{cm}^2$ ).

Bei den Expositionen mit der MID-DOSE-Konzentration an EC-Partikeln, die die stärksten Effekte bewirkten, wurde unter submersen Bedingungen 3  $\mu\text{g}$  EC-Partikel/ $\text{cm}^2$  eingesetzt, während an der LMG im Mittel bereits 0,2  $\mu\text{g}$  EC-Partikel/ $\text{cm}^2$  ausreichend waren. Demnach traten vergleichbare Effekte an der LMG durch eine 15-fach geringere Partikeldosis im Vergleich zu submersen Expositionen auf.

*Die A549-Zellen zeigten bei submerser und LMG-Exposition tendenziell die gleiche Zellantwort in Abhängigkeit vom Dosisbereich. Dabei reagierten die an der LMG exponierten Zellen weitaus sensitiver als Zellen, die unter submersen Bedingungen exponiert wurden.*

#### **3.7.5 Biologische Konsequenzen und Bedeutung der zellulären Stressantwort auf ultrafeine Partikel**

Das breite Screening von Genexpressionen zeigte in dieser Studie, dass durch Exposition von A549-Epithelzellen an der LMG mit EC-Partikeln eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Genen reguliert wird. Von besonderer Bedeutung ist die Beteiligung von HSPA6 und HO1 an der biologischen Zellantwort, die insbesondere bei Expositionen an der LMG eine starke Dosisabhängigkeit zeigte. Im MID-DOSE-Expositionsbereich können in den A549-Zellen als Folge dieser Antwort Schutzmechanismen aktiviert und überschießende

Entzündungsmechanismen unterdrückt werden. Im HIGH-DOSE-Bereich lag hingegen eine suppressive Wirkung der Partikel auf die HSP-Expression vor. Das bedeutet, dass diese Schutzmechanismen weitgehend unterdrückt werden. Dadurch könnten zytotoxische Wirkungen stärker zur Geltung kommen, die die Zelle in den kontrollierten Zelltod führen. Dieser Prozeß könnte unter anderem durch eine hohe Belastung mit den bereits erwähnten Partikel-assoziierten Radikalen verursacht werden. Auch könnte die Kontamination der Partikel mit organischen Kohlenwasserstoffverbindungen hier einen zunehmend schädlichen Einfluss ausüben.

Das in der Studie am deutlichsten regulierte Gen HSPA6 gehört zur Klasse der HeatShock-Proteine. HeatShock-Proteine sind eine Familie von strukturell und funktionell hoch konservierten Proteinen. Es gibt mindestens 11 Gene, die für Vertreter der Gruppe der humanen HSP70-Proteine (HSPA1 bis HSPA9) kodieren (Tavaria et al., 1996). Die c-DNA für HSPA6 (= HSP70B') wurde erstmals 1990 isoliert und charakterisiert (Leung et al., 1990). In humanen Fibroblasten zeigten Leung et al., dass die HSPA6-Expression nicht durch leichten Hitzeschock bei 42 °C, jedoch durch stärkeren Hitzeschock bei 45 °C induzierbar ist. Das bedeutet für die vorliegende Studie, dass die Expressionsänderungen nicht durch Temperaturschwankungen im Bereich (37 ± 1) °C im neu entwickelten Expositionssystem ausgelöst werden konnten (siehe Kapitel 2.5). Die Expression von HSPA6 (HSP70B') ist im Vergleich zu HSPA1A (HSP70) nicht nur weniger sensitiv gegenüber erhöhten Temperaturen, sondern auch gegenüber CdCl<sub>2</sub>. Zum HSPA7 (HSP70B), als ein weiteres HSP-Gen in dieser Subklasse, zeigt HSPA6 eine 94 %ige Homologie (beide auf Chromosom 1 lokalisiert), während zu dem auf Chromosom 6 lokalisierten HSP70-1 (HSPA1A) bzw. HSP70-2 (HSPA1B) nur eine 77 %ige Homologie besteht (Leung et al., 1992; Leung et al., 1990).

Das Zusammenspiel von Stressproteinen aus der HSP70-Familie, wie dem HSPA6, und der HO1 nach Partikelexposition wurde bereits beschrieben. So wurde 1997 über eine vermehrte Produktion von HO1 und HSP70 in humanen Monozyten durch Tabakrauch berichtet (Pinot et al., 1997). Des Weiteren war bei einer transfizierten antisense-hsp70-P-19-Zelllinie aus der Maus außer der verminderten HSP70-Antwort auf Hitzestress (45 °C, 20 min) auch die HO1-Antwort der Zelle inhibiert (Nishimura et al., 2000), ein Befund, der die enge regulatorische Kupplung dieser beiden Gene unterstreicht. Hirano und Kollegen konnten in Endothelzellen der Ratte nach Exposition mit Dieselrußextrakten und feinen Umweltpartikeln (unter 2 µm) die Expression von HO1 und HSP72 nachweisen, wobei die

Erhöhung der Expressionen dieser Gene bei den Dieselrußextrakten im Vergleich zu Extrakten der Umweltpartikel höher ausfiel (Hirano et al., 2003). Da die Effekte in dieser Studie durch N-Acetylcystein (NAC) inhibierbar waren, wurde postuliert, dass die Unterschiede in der Genexpression durch lösliche organische Komponenten auf den Partikeln und durch oxidativen Stress verursacht worden waren. Für die vorliegende Studie kann gegenwärtig keine Aussage darüber gemacht werden, ob und mit welchem Anteil die nachgewiesene Beladung der für die Exposition eingesetzten EC-Partikel mit circa 6 % Organika einen Einfluss auf die Expression von HSPA6 und HO1 haben.

Die HO1-Expression ist ein sensitiver Marker für oxidativen Stress und ist über das „antioxidative response element“ (ARE) im HO1-Promoter reguliert (Chen et al., 2003; Keyse and Tyrrell, 1989; Prestera et al., 1995). Die Regulation erfolgt über den Transkriptionsfaktor NRF-2, der auch an der Hochregulation weiterer antioxidativ wirkender Enzyme bei Einwirkung von oxidativem Stress beteiligt ist (Alam et al., 1999; He et al., 2001). Die biologische Signifikanz des Enzyms HO1 in der Lunge begründet sich durch seine antioxidative Wirkung (Choi and Alam, 1996). Beim Häm-Abbau wird Biliverdin gebildet, das durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin, einem Peroxid-Radikalfänger, umgewandelt wird (Stocker et al., 1987). Die antioxidative Potenz der HO1 belegt eine Studie mit HO1-defiziente murine Fibroblasten und Leberzellen, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zeigen (Poss and Tonegawa, 1997). Zusätzlich wird beim Häm-Abbau gasförmiges CO gebildet, das antiinflammatorische Effekte zum Beispiel über die Stimulierung der Guanylatcyclase beeinflussen kann und im Exhalat als Marker für entzündlichen Lungenerkrankungen genutzt wird (Horvath et al., 1998). Die HO1-Freisetzung in Epithelzellen konnte nach der Exposition mit 50 µg/ml uf-CAPs, nicht jedoch mit der gleichen Menge feiner CAPs gezeigt werden (Li et al., 2003). Dies spricht für eine erhöhte Potenz der uf-Partikel bei der Generierung von oxidativen Stress. In der bronchialen Epithelzelllinie Beas-2B wurde ein Anstieg der HO1 nach Exposition mit 50 µg/ml ultrafeinen CAPs gezeigt (Li et al., 2003). Eine Hochregulation von HO1-m-RNA durch Umwelttoxene ist mehrfach beschrieben worden, beispielsweise durch DEP im Lungengewebe von Mäusen nach Inhalation (Risom et al., 2003), in mit DEP behandelten Makrophagen (Li et al., 2000), bei Expositionen von humanen Makrophagen mit Benzo[a]pyren beladenen „carbon black“ Modellpartikeln (Chin et al., 2003) und in humanen Endothelzellen, die mit Tabakrauchkondensat behandelt worden waren (Vayssier-Taussat et al., 2001).

Oxidativer Stress ist eine häufig beschriebene Form von Stress, der durch Partikel oder deren Extrakte induziert wird und zur Expression von Stressproteinen oder inflammatorischen Zytokinen führt. Nach Li et al. (2002b) kann die durch oxidativen Stress erzeugte Wirkung in Epithelzellen und Makrophagen durch Extrakte von Dieselrußpartikeln wie folgt eingeteilt werden: 1) Als Antwort auf geringen oxidativen Stress wird bei unverändertem Glutathionspiegel vermehrt HO1 exprimiert. 2) Bei mittlerem oxidativen Stress wird die Jun-Kinase aktiviert und vermehrt IL8 gebildet. 3) Ein starker oxidativer Stress ist mit einem steilen Abfall des GSH/GSSG-Verhältnisses verbunden und führt letztendlich zum kontrollierten Zelltod. Die Autoren gehen also von einer abgestuften zellulären Antwort auf oxidativen Stress aus, wobei bei niedrigen Konzentrationen der Noxe zytoprotektive Effekte im Vordergrund stehen, während bei erhöhten Konzentrationen proinflammatorische und bei hohen Konzentrationen schließlich zytotoxische Effekte auftreten. Weitere Untersuchungen von Li et al. (2002c) haben gezeigt, dass bronchiale Epithelzellen im Vergleich zu Makrophagen ein deutlich niedrigeres Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSH/GSSG-Verhältnis) aufweisen. Dies bedeutet, dass bronchiale Epithelzellen gegenüber oxidativen Einflüssen susceptibler reagieren als Makrophagen und dadurch eher Effekte einer zytotoxischen Wirkung zeigen. Eine Absenkung des GSH/GSSG-Verhältnisses durch Behandlung mit Dieselrußextrakt in beiden Zellspezies konnte durch Zugabe von N-Acetylcystein in Makrophagen jedoch nicht in Epithelzellen verhindert werden. Dies belegt die erhöhte Empfindlichkeit von Epithelzellen auf eine oxidative Irritation. Das oben erwähnte Muster einer abgestuften Antwort von Makrophagen und Epithelzellen unter submersen Bedingungen auf unterschiedliche Dosen von Dieselrußextrakt kann nur eingeschränkt auf die Exposition von Epithelzellen mit ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln an der LMG übertragen werden. Dies liegt unter anderem daran, dass durch Dieselrußextrakte im Vergleich zu ultrafeinen Partikeln andere Spezies von Oxidantien generiert werden, die zudem in anderen subzellulären Kompartimenten zur Wirkung kommen. Bei der Exposition mit ultrafeinen Partikeln im LOW-DOSE-Bereich ist der oxidative Stress zu gering, um die HO1-Expression merklich zu stimulieren. Der bei einer mittleren Partikeldosis induzierte oxidative Stress ist dagegen bereits ausreichend für eine deutliche Erhöhung der HO1-Transkription und die Aktivierung weiterer Schutzmechanismen, wie der Transkription des HeatShock-Proteins HSPA6. Mit hohen Partikeldosen und entsprechend hohem oxidativem Stress versagen diese Schutzmechanismen, wobei der Mechanismus ihrer Suppression nicht bekannt ist. Direkte



zytotoxische Prozesse nach Exposition mit hohen Partikeldosen waren durch die angewendeten Viabilitäts-Tests nicht nachweisbar.

Eine erhöhte Menge des IL8-Transkripts als Marker eines proinflammatorischen Geschehens trat bei Exposition an der LMG nur tendenziell nach Exposition mit niedrigen und mittleren Dosen der EC-Partikel auf. Eine Erklärung dafür ist, dass mit einer für die erforderliche Dosis deponierter Partikel notwendigen 6-stündigen Exposition (zusätzlich 1 h Nachinkubation mit TNF) das Zeitoptimum für die Bildung des IL8-Transkripts überschritten und es daher nicht mehr nachweisbar war. Die Erhöhung der IL8-Transkriptmenge nach submerser EC-Exposition hatte sein Maximum bereits nach 1 - 2 h erreicht.

*Aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie wird die Hypothese abgeleitet, dass durch uf-Partikel ein oxidativer Stress in Epithelzellen der Lunge erzeugt wird. Dies führt zur Hochregulation der Genexpression von HO1 als ein hochsensitives antioxidatives System und von HSP70B' aus der HSP70-Familie, das als molekulares Chaperon fungiert. Die Produkte beider Gene nehmen eine gemeinsame Funktion wahr, nämlich den Schutz der Zelle vor Partikel-induziertem Stress, der in der vorliegenden Studie durch reaktive Modellpartikel aus Kohlenstoff ausgelöst wurde. Während eine Beteiligung von redoxaktiven Metallionen bei diesen Effekten ausgeschlossen werden kann, ist die Rolle der organischen Kontaminationen auf der Partikeloberfläche ungeklärt. Es ist anzunehmen, dass die mit der Partikelmatrix assoziierten Radikale, sowie die sehr große spezifische Oberfläche der ultrafeinen Partikel an der zellulären Reaktion auf die Exposition an der LMG beteiligt sind. Die deutlich geringere Antwort bei Exposition unter submersen Bedingungen ist zumindest partiell darauf zurückzuführen, dass reaktive Bereiche auf der Partikelmatrix bereits extrazellulär mit Komponenten des Mediums reagieren und dadurch ihr inflammatorisches Potential gegenüber den Targetzellen verlieren.*

*Die Technologie zur Exposition von Zellen an der LMG soll in zukünftigen Arbeiten auch dazu verwendet werden, die Wirkung von uf-Partikel auf komplexere Zellsysteme, wie beispielsweise Kokulturen von primären Epithelzellen mit Makrophagen und dendritischen Zellen unter Miteinbeziehung von Bestandteilen des Surfactants zu untersuchen. Ziel ist es, ein weiterentwickeltes Zellexpositionsmodell als Target zu verwenden, um die Interaktion von uf-Partikel mit Zellen des Alveolarepithels unter möglichst realistischen Bedingungen zu simulieren.*

## 4 Zusammenfassung

In urbanen Gebieten ist unsere Atemluft mit hohen Konzentrationen von uf-Partikeln unterschiedlicher Herkunft und Beschaffenheit belastet. Von diesen Partikeln geht ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aus, da beispielsweise eine abnehmende Lungenfunktion und akute Symptome im Bereich der oberen und unteren Atemwege beobachtet wurden (Peters et al., 1997). Nach Inhalation wird ein Teil der Partikel in den Atemwegen und Alveolen deponiert, so dass es dort zu einer Wechselwirkung mit verschiedenen Targetzellen kommt. Dies sind neben Alveolarmakrophagen insbesondere Zellen des Bronchial- und Alveolarepithels. Nach neueren Untersuchungen können Epithelzellen uf-Partikel aufnehmen (Foster et al., 2001) und dadurch oxidative und inflammatorische Effekte auslösen (Li et al., 2002c).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Apparatur etabliert, in der Epithelzellen *in-vitro* mit luftgetragenen uf-Partikeln unter kontinuierlicher dosimetrischer Kontrolle exponiert werden können. Dieses neue Kammersystem führt weg von der submersen Exposition mit Agglomeraten von uf-Partikeln hin zur natürlichen Situation, indem die Zellen an der Grenzschicht zwischen dem Aerosol und dem Versorgungsmedium kultiviert werden. Mit diesem System ist sowohl die Anzahl als auch die Masse der auf den Epithelzellen deponierten Partikel online exakt bestimmbar und ermöglicht dadurch realistische Aussagen über die Dosis-Wirkungsbeziehungen für ultrafeine Aerosole. In einem ersten Schritt wurde das Verhalten eines ultrafeinen Kohlenstoff-Aerosols während seiner Passage durch die Expositionsanlage hinsichtlich Partikelanzahl und -größe charakterisiert und optimiert, indem die Feuchtigkeit und Temperatur des Aerosols an die Bedingungen in der Lunge angepasst wurden.

Um die biologische Wirkung von umweltrelevanten uf-Partikeln zu simulieren, wurden Epithelzellen für sechs Stunden mit  $1,2$  bis  $3,2 \times 10^6$  Kohlenstoffpartikeln/cm<sup>3</sup> eines Modellaerosols mit einer Partikelgröße von 80 bis 120 nm exponiert. Hierbei diente eine humane alveoläre Zelllinie (A549) als Modell für eine relevante Targetzelle in der peripheren Lunge. Die Zellen wurden auf Anodisk-Membranen zu einer weitgehend konfluenten Monolage unter Vermeidung mehrlagiger Zellschichten kultiviert und an der Luft-Medium-Grenzschicht exponiert.

Die Viabilität der Zellen nach Exposition an der LMG unter Standardbedingungen ohne Partikel (d.h. nach Filterung des Aerosols) lag geringfügig unterhalb der Viabilität submerser Kontrollzellen. Jedoch zeigte die erhöhte Transkription sowohl der proinflammatorischen Zytokine IL8 und IL6 als auch der zytoprotektiven HeatShock-Proteine HSPA6 und HO1, dass die Zellen an der LMG empfindlich auf exogenen Stress reagieren.

Mit Hilfe der Array-Technik wurden Expressionsveränderungen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Die meisten der nach dieser Methodik identifizierten Kandidatengene für Partikel-induzierte Transkription konnten mit Hilfe der LC-PCR nicht bestätigt werden. Die Clontech-Array-Analyse der Zellen aus der MID-DOSE-Exposition ergab geringgradig veränderte Expressionen bei den Genen FRA1, CASP10 und den Chemokinen MCP1, IL8 und GCP2, während mit Hilfe der Affymetrix-GeneChip-Analyse der LOW- oder HIGH-DOSE-Exposition tendenzielle Veränderungen in der Expression der Gene BIRC5, DC12, ZNF144 und HSPA6 beobachtet wurden. Mittels LC-PCR konnten signifikante Effekte auf die Transkription von HSPA6 und HO1 durch die Exposition mit EC-Partikeln nachgewiesen werden. Sowohl an der LMG, als auch unter submersen Bedingungen waren die Transkriptionsraten der beiden Gene nach Exposition mit einer mittleren EC-Dosis (MID-DOSE) stark erhöht; zusätzlich wurden sie an der LMG durch eine Nachstimulation mit TNF erheblich gesteigert. Im Gegensatz dazu fiel die Transkription der beiden Gene nach Exposition mit einer hohen EC-Dosis (HIGH-DOSE) auf den Kontrollwert zurück. Dies könnten bereits erste Anzeichen zytotoxischer Effekte sein, die jedoch bei der Analyse der Viabilität der Zellen noch nicht erkennbar sind.

Die stark erhöhte Expression des HO1-Gens bei einer MID-DOSE-Exposition der Zellen spricht für einen massiven oxidativen Stress, der durch die Partikel vermittelt wird. Die gleichzeitige Hochregulation von HSPA6 mit seiner protektiven Funktion unterstützt dabei die antioxidative Funktion der HO1. Bei Expositionen der Zellen an der LMG genügte im Vergleich zu submersen Expositionen um ca. 15-fach niedrigere Dosen, um vergleichbare Effekte zu erhalten. Mit dieser Studie wurde ein *in-vitro*-Expositionssystem erfolgreich etabliert, das mit einer integrierten Dosis-Analytik für uf-Partikel die Exposition von relevanten Zielzellen der Lunge (Mensch, Maus, Ratte) an der LMG mit ultrafeinen Aerosolen unter realitätsnahen Bedingungen ermöglicht. Die genomweite Analyse biologischer Endpunkte mit in diesem System exponierten Zellen ermöglicht die Identifikation neuer pathophysiologisch relevanter Wege.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Reagenzien

[ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP,

3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml	PB10204	Amersham, Freiburg
Agarose Gold	Qualex Gold	AGS, Heidelberg
Ammoniumacetat-Lösung, 7,5 M	A-2706	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumthiocyanat	A-7149	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	1.12015	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau (= 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein)	B-5525	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	C-2432	Sigma, Taufkirchen
Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1	X205	Amresco, Solon, USA
DEPC, Diethylpyrocarbonat	D-5758	Sigma, Taufkirchen
DNA-Molecular-Weight-Marker VI	1062590	Roche, Mannheim
Dnase-I, 10 U/ $\mu$ l	776785	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	E-5134	Sigma, Taufkirchen
Einmalspritze, 10 ml, Plastipak	300865	Becton Dickinson, Heidelberg

---

Enzo-Bioarray-High-Yield-RNA-Transkript	900182	Affymetrix, Labeling-Kit, Santa Clara, CA, USA
Ethanol, absolut	1.00983	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	E-2515	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	F-8775	Sigma, Taufkirchen
Formamid	F-9037	Sigma, Taufkirchen
g-DNA	genomische DNA aus $2 \times 10^7$ A549-Zellen mit DNeasy-Tissue-Kit, Quiagen, Hilden	
Glycerin	G-5516	Sigma, Taufkirchen
Glycogen, Typ-IX aus der Rinderleber	G-0885	Sigma, Taufkirchen
Guanidinthiocyanat	G-9277	Sigma, Taufkirchen
Hoechst 33258	H-1398	Bisbenzimid, MoBiTec, Göttingen
Isopropanol	I-9516	Sigma, Taufkirchen
Kanüle, Venofix	04048083	B.Braun, Melsungen
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.04873	Merck, Darmstadt
Lachs-Sperma-DNA	D-7656	Sigma, Taufkirchen
LPA	9520	Ambion, Huntingdon, UK
Mineralöl	M-5904	Sigma, Taufkirchen
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	M-0250	Sigma, Taufkirchen
MOPS (= 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	M-8899	Sigma, Taufkirchen
$\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2\text{H}_2\text{O}$	C-8532	Sigma, Taufkirchen
NaCl	S-9625	Sigma, Taufkirchen
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	S-3139	Sigma, Taufkirchen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4984.1	Roth, Karlsruhe

## 5. Experimenteller Teil

---

NaOH	S-0899	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	S-2889	Sigma, Taufkirchen
PhaseLock-Gel	0032 007.961	Eppendorf, Hamburg
Phenol	P-1037	Sigma, Taufkirchen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (pH 8,0; Mischungsverhältnis 25:24:1)	P-2069	Sigma, Taufkirchen
Prolong-Antifade	P-7481	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
RNeasy-mini-Kit	74104	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	N808-0119	Applied Biosystems Foster City, CA,USA
SDS, Sodiumdodecylsulfat	L-5750	Sigma, Deisenhofen
Superscript c-DNA-Synthesis-Kit	11917-010	Invitrogen, Karlsruhe
T7T23V-Primer		Eurogentec, Seraing, Belgien
TNF, human, rekombinant, $6,6 \times 10^6$ U/ml		von Prof. Dr. Männel, Universität Regensburg
Tri-Reagent	T-9424	Sigma, Taufkirchen
Tris-Base (= Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	T-6791	Sigma, Taufkirchen
Tris-HCl	100840	Paesel-Lorei, Hanau
Triton X-100	807423	ICN, Eschwege
t-RNA, aus Brauhefe	109517	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Trypanblau	T-6146	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA-Lösung 0,25 %	T-4049	Sigma, Taufkirchen
Wasser, reinst	W-4502	Sigma, Taufkirchen

WST1-Reagenz	1644807	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ziegenserum	16210-064	Life Technologies, Leopoldshafen

### 5.1.2 Lösungen und Medien

A549-Medium	Dulbecco's MEM/ Nut Mix F12 1:1 (DMEM/F12), mit Glutamin und 15 mM HEPES 31330-038 Gibco Invitrogen, Karlsruhe + 10 % FCS + 5 ml Pen/Strep	
Agarosegel (denaturierend, für RNA)	4,57 g ad 400 ml	Agarose DEPC-H <sub>2</sub> O; erhitzen bis die Agarose geschmolzen ist 1,7 ml 10 x MOPS-Puffer 2,5 ml Formaldehyd (12,3 M)
Antikörper- Verdünnungspuffer (= Abdil)	Triton X-100 0,1 % Ziegenserum 2,0 % In PBS	
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % DEPC zu destilliertem Wasser zugeben und kräftig schütteln, über Nacht stehen lassen, vor Gebrauch autoklavieren	

## 5. Experimenteller Teil

---

10 x DNA-Denaturierungslösung	4 g	NaOH (1 M)
	0,372 g	EDTA (10 mM)
	ad 100 ml	Wasser, reinst
10 x DNase-I-Puffer	6,3 g	Tris-HCl (400 mM)
	0,584 g	NaCl (100 mM)
	1,2 g	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (60 mM)
	ad 100 ml	Wasser, reinst; pH 7,5
10 x Dnase-I-Terminationsmix	3,72 g	EDTA (0,1 M)
	0,1 g	Glycogen (1 mg/ml)
	ad 100 ml	Wasser, reinst; pH 8,0
Fötale Kälberserum (FCS)	S 0115	Lot 477U, Seromed low endotoxin Biochrom AG, Berlin
LB-Medium	10 g	Hefeextrakt
	5 g	Bacto-Trypton
	5 g	NaCl
	18 g	Agar
	ad 1 L Wasser destilliert, die Lösung autoklavieren, in Petrischalen ausgießen und unter der Sterilbank trocknen	



---

10 x MOPS-Puffer	83,72 g	MOPS (0,4 M)
	8,2 g	Natriumacetat (0,1 M)
	3,7 g	EDTA (10 mM)
	ad 1 L	DEPC-H <sub>2</sub> O; pH 7,0; vor Gebrauch autoklavieren
NaCl 0,9 % (isotonisch)	pH 7,4	vor Gebrauch autoklavieren
Natriumacetat-Lösung 2M	16,41 g	Natriumacetat
	ad 100 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O; pH 4,5
2 x Neutralisierungs-Lösung	12,0 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)
	ad 100 ml	Wasser, reinst
O.D.-Messpuffer	788 mg	Tris-HCl (50 mM)
	3,72 mg	EDTA (0,1 mM)
	ad 100 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O; pH 7,5
PBS	57 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	18 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	75 mM	NaCl
		pH 7,4, vor Gebrauch autoklavieren
Pen/Strep	A 2213	Penicillin 10 <sup>4</sup> U/ml, Streptomycin 10 <sup>4</sup> µg/ml Biochrom AG, Berlin

## 5. Experimenteller Teil

---

Phenollösung, gesättigt; pH 4,0	100 g 65 ml	Phenol (schmelzen bei 70 °C) Sättigungspuffer für Phenol
RNA-Ladepuffer	45 µl 45 µl 5 µl 3,5 µl 1,5 µl 8 µl	Formaldehyd 12,3 M Formamid 10 x MOPS-Puffer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) EDTA-Lösung (0,1 M; pH 7,5) Bromphenolblau-Lösung (5 µg/ml)
Sättigungspuffer für Phenol	12,30 ml 16,25 ml ad 65 ml	Glycerin (19 %) Natriumacetat-Lösung 1 M; pH 4,0 Wasser, reinst; pH 4,0
20 % SDS-Lösung	200 g	SDS, ad 1 L Wasser, destilliert
20 x SSC-Lösung	175 g 88,2 g ad 1 L	NaCl Na <sub>3</sub> Citrat x 2H <sub>2</sub> O Wasser destilliert; pH 7,0
0,5 x TBE-Puffer; pH 8,0	45 mM 45 mM 1 mM	Tris-Base H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> EDTA
Trypanblau-Lösung	0,2 %	in PBS, sterilfiltrieren

Waschlösung-I	2 x SSC, 1 % SDS	
Waschlösung-II	0,1 x SSC, 0,5 % SDS	
Zell-Denaturierungs- lösung	31,9 g	Guanidinthiocyanat
	9,9 g	Ammoniumthiocyanat
	10 ml	Natriumacetat-Lösung 1 M; pH 4,0
	ad 100 ml	Wasser, reinst; pH 4,0

### 5.1.3 Lösungen für Expressionsanalysen

Amplifikations-Mix für konventionelle PCR (Clontech-Array)	8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM), A00649
	8 µl	10 x PCR-Puffer, J0226
	0,5 µl	AmpliTaQ-DNA-Polymerase (5 U/µl), G1362
		alle von PE Applied Biosystems, Weiterstadt
	59,5 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
	2 µl	5' Primer
	2 µl	3' Primer
Amplifikations-Mix für LightCycler-PCR	10,8 µl	H <sub>2</sub> O
	3,2 µl	MgCl <sub>2</sub> Stock (25 mM)
	0,5 µl	5' Primer
	0,5 µl	3' Primer
	2,0 µl	SYBR-Green I Master-Mix
		2239264, Kit von Roche Diagnostics, Mannheim

## 5. Experimenteller Teil

---

Atlas-Human-1.2.- Array-Kit	BD Atlas-Array-Membranen, 10 x dNTP-Mix CDS-Primer-Mix 5 x Reaktionspuffer MMLV-Reverse-Transkriptase (50 U/ $\mu$ l) 10 x RT-Terminationsmix DTT (100 mM) Kontroll-Poly-A <sup>+</sup> -RNA C <sub>0</sub> t-1-DNA BD-ExpressHyb-Hybridisierungslösung Deionisiertes Wasser NucleoSpin <sup>®</sup> -Extract-Kit, 634527, Clontech, Heidelberg
dNTP-Mix	320 $\mu$ l dATP (10 mM), G1667 320 $\mu$ l dCTP (10 mM), G1668 320 $\mu$ l dGTP (10 mM), G1669 320 $\mu$ l dTTP (10 mM), G1670 von PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Reverser Transkriptions-Mix	4 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (25 mM), A00649 2 $\mu$ l 10 x PCR-Puffer, J0226 1 $\mu$ l Oligo dT <sub>16</sub> (50 $\mu$ M), N8008-0128 alle von PE Applied Biosystems, Weiterstadt 8 $\mu$ l dNTP-Mix (aus G1667,1668,1669,1670) 1 $\mu$ l RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l MuLV-Reverse-Transkriptase (50 U/ $\mu$ l) von Applied Biosystems, Foster City, CA,USA

Verdünnungspuffer	2 µl	t-RNA (6,5 µg/ml)
	28 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
	20 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	10 µl	10 x PCR-Puffer
	40 µl	dNTP

alle von PE Applied Biosystems, Weiterstadt

#### 5.1.4 Zellkulturmaterial und Reagenzgefäße

Anodisk-Membran, 47mm	WHAT 6809-5022	über VWR, Ismaning
Mehrfachkulturschalen	24er-Wells	Corning Costar, Über VWR, Ismaning
Objektträger, 35 x 12 mm	3562123	Schütt Labortechnik, Göttingen
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	0030120086	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, 0,5 ml	0030121023	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche	658175	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturpetrischale	60 x 15 mm	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturpetrischale	100 x 15 mm	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber, 23 cm	179693	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen aus PP	15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen



---

Elektrophoresegerät	Horizon 58, horizontal, Life Technologies, Leopoldshafen
Elektrophorese-Netzgerät	ST606T, Life Technologies, Leopoldshafen
Filmkassette	1007327, 20 x 25 cm, Kodak, Stuttgart
Filterpapier	zur Auskleidung der Befeuchtungsstrecke, 7 x 38 cm, 3 mm Chr, 3030917, Whatman, Maidstone, UK
Flachbettscanner	Agfa-Snapscan-1236, Agfa, Köln
Funkengenerator	GFG1000, Palas, Karlsruhe
Gelbetrachter	UVP-TS20, Uni Equipe, Martinsried
Glas-Array	GeneChip HG-U133A, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Gradient Container 6 x 47	4704, MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs-GmbH, Bad Abbach
Graphitelektroden	RW0, SGL Carson AG, Bonn
Heizblock (Schüttel-)	Thermomixer 5437, Eppendorf, Hamburg
Heizplatte (Präzisions-)	Präzitherm, PZ72, 430 x 580 mm, 20 - 300 °C Störk-Tronic über Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Hybridisierungsflaschen	GFL, Burgwedel
Hybridisierungsöfen	Modell 7601, GFL, Burgwedel
Infusionsbesteck	Transfusionsgerät, Travenol GmbH, München
Kernzähler	CPC 3025, TSI Incorporated Particle Instruments, St Paul, MN, USA
LightCycler	Roche Applied Science, Mannheim
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 410, konfokal, Zeiss, Jena
Netzgerät	Harrison 6205B Dual, Hewlett Packard
Nylon-Array	7850-1, Atlas-Human-1.2, Clontech, Heidelberg

## 5. Experimenteller Teil

---

PALL-Filter	BB50TE, strahlensterilisiert PALL, Newquay, UK
Partikelmeßsystem (Kernzähler + Differentieller Mobilitätsanalysator)	SMPS 3080, TSI Incorporated Particle Instruments, St Paul, MN, USA
PCR-Gerät	Touchdown-Cycler, Hybaid, Teddington, UK
Perfusionspumpe	Perfusor-VI-Type 871 222/0, B.Braun AG, Melsungen
Perfusor-Spritze	50 ml, 08728810, B.Braun AG, Melsungen
Plexiglashaube	Eigenanfertigung, 75 x 60 x 45 cm
Plexiglaswasserbad	Eigenanfertigung, 27 x 22 x 13 cm
Röntgenfilm	1165893, Biomax-MS-Film, 20 x 25 cm, Kodak, Stuttgart
Rundkolben	100 ml, aus Glas
Scansoftware Snapscan	Agfa-FotoLook3, Version 1.2.0.5, Agfa, Köln
Schlauchpumpe	Minipuls 2, Gilson Medical Electronics, Frankreich, über Abimed, Düsseldorf
Schüttelgerät	VM3, CAT, Kremer&Kreiler Laborgeräte, München
Sofortbildkamera	Polapan 400, s/w, 9 x 12 cm, Polaroid, Cambridge, UK
Spannringe	MINUSHEET 4700, MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs-GmbH, Bad Abbach
Spektralphotometer	DU640, Beckmann, München
Szintillationszähler	TriCarb 2100TR, Canberra-Packard, Dreieich
Temperatur- und Feuchtigkeitsmessgerät	testo635, testo, Lenzkirchen
Thermostat	JulaboV in Plexiglaswasserbad eingehängt, Julabo Labortechnik KG, Juchheim
Ultraschallbad	Sonorex RK 52, Bandelin, Berlin



Vakuumpumpen	DC12/08NK, Fürgut, Tannheim
Verstärkerfolie	8548706, Biomax-MS-Screen, 20 x 25 cm, Kodak, Stuttgart
Zählkammer	Neubauer improved, Hecht Assistent, Sondheim
Zentrifuge	1-15K, Laborzentrifuge für Eppendorf-Gefäße Kühlbar, Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge	3K15, Laborzentrifuge für Zentrifugenröhrchen Kühlbar, Sigma, Osterode am Harz

## **5.2 Etablierung des Systems zur Exposition von adhärennten Zellen mit ultrafeinen Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht**

Zellen des alveolären Epithels werden bei jedem Atemzug mit luftgetragenen feinen und ultrafeinen Partikeln konfrontiert, während größere Partikel bereits in den Bronchien durch Sedimentation oder Impaktion abgeschieden werden. Um die Deposition von uf-Partikeln in der Lungenperipherie experimentell zu simulieren, wurde ein *in-vitro*-System (Expositionskammer) entwickelt, das eine quantitativ messbare Exposition von Targetzellen mit diesen Partikeln an der Luft-Medium-Grenzschicht ermöglicht (Tippe et al., 2002).

Grundlage für diese Expositionskammer ist eine kommerzielle Perfusionskammer für Zellkulturen, die auf einem porösen Membranträger als monozelluläre Schicht wachsen (MINUCCELL, Bad Abbach). Im Unterschied zur üblichen Technologie mit submersen Kulturen können damit die Zellen von unten über Membranporen mit Medium versorgt werden, während die Membranoberfläche mit den Zellen direkten Kontakt zur Atmosphäre und dem darin enthaltenen Aerosol hat. Die Deposition von Aerosolpartikeln auf der Zellkulturschicht wurde mittels einer vertikalen Staupunktströmung des Aerosols gegen die Zellschicht erzwungen. Durch eine genaue Kenntnis von Geometrie und Geschwindigkeitsprofil dieser Strömung (aus Messungen mit der Methode der Particle-Image-Velocimetry) konnten Antransport, Diffusion und Sedimentation der Aerosolpartikel berechnet und damit die Partikeldeposition aus den gemessenen Parametern Volumenstrom und Partikelkonzentration quantitativ bestimmt werden. Für die in der Studie von Tippe et al. (2002) verwendeten Expositionskammer mit 10 mm Membrandurchmesser

und einer Staupunktströmung mit der Reynoldszahl  $Re = 6,3$  ( $Re = du/2v$ , mit  $d$  als Durchmesser des Anstromrohres,  $u$  als mittlere Flussgeschwindigkeit in diesem Rohr und  $v$  als kinematische Viskosität des Aerosols) konnte gezeigt werden, dass 2 % der anströmenden Aerosolpartikel auf der Zellschicht deponiert werden. REM-Untersuchungen ergaben, dass die deponierten Partikel dabei homogen über die Zellschicht verteilt waren.

Für die vorliegende Expositionsstudie an alveolären Epithelzellen mit uf-EC-Partikeln musste der Aufbau der Expositions-kammer in zwei wesentlichen Punkten verändert werden. A) Um eine ausreichende Menge exponierter Epithelzellen für die Microarray-Analysen zu erhalten, wurde der Durchmesser der Membran von 10 mm auf 47 mm erhöht. B) Zur Erhöhung der Messgenauigkeit und zur Kontrolle der Einzelmessungen wurden jeweils drei Expositions-kammern in einem Gehäuseblock untergebracht. Dabei war darauf zu achten, dass in den einzelnen Kammern möglichst gleiche Bedingungen für die Zellkultur und Partikeldeposition herrschten.

Als Basis für die neue Expositions-kammer konnte auf Dreifach-Perfusionskammern („Gradient Container“ in Blockbauweise) mit 47 mm Membrandurchmesser von MINUCCELL zurückgegriffen werden. Neu zu berechnen waren die Geometrie der Staupunktströmung und die Bedingungen für einen gleichzeitigen und identischen Aerosolanstrom in allen drei Expositionseinheiten. Die Geometrie der Staupunktströmung wurde unter der Voraussetzung einer unveränderten Reynoldszahl und somit gleicher Strömungseigenschaften für die kleine und die große Expositions-kammer bestimmt. Die Berechnungen ergaben für die große Kammer einen Radius von  $r = 12$  mm gegenüber 3 mm bei der kleinen Kammer für das Anstromrohr, einen Abstand von 4 mm gegenüber 1 mm zwischen dem Ende des Anstromrohres und der Membran mit der Zellschicht, und einen Fluss von 250 ml/min gegenüber 60 ml/min. Die Gültigkeit dieser theoretisch bestimmter Dimensionen wurde hinsichtlich der Partikeldeposition und der Homogenität der Partikelverteilung über die Zellschicht, wie in der Arbeit von Tippe und Kollegen (Tippe et al., 2002) beschrieben, mit REM überprüft. Wie erwartet, konnte dabei gezeigt werden, dass auch in der großen Kammer 2 % der anströmenden Partikel auf der Membran deponiert werden. Zur Gewährleistung identischer Bedingungen für die Staupunktströmung innerhalb der drei Expositionseinheiten wurde eine gemeinsame Aerosolquelle und gleiche Druckverhältnisse für die Strömung etabliert. Die Wirksamkeit dieser technischen Maßnahmen auf die Partikeldeposition in den drei Expositionseinheiten wurde wieder mit REM überprüft (A. Tippe, persönliche

Mitteilung). Das Medium zur Versorgung der Zellkulturen auf den Membranen wurde in einem geschlossenen Kreislauf durch alle drei Expositionseinheiten eines Gehäuseblocks gepumpt (siehe 5.2.1.4, Seite 113).

### 5.2.1 Versuchsaufbau

Das für die vorliegende Arbeit etablierte Expositionssystem besteht aus einem Palas-GFG1000-Generator, einem Verdünnungssystem für das Aerosol, einer Befeuchtungseinheit, zwei Expositionskammern mit je drei Expositionseinheiten, die durch ein Plexiglasbehälter auf 37 °C temperiert werden, einer SMPS-Messeinheit mit CPC 3025 und einer Vakuumpumpe mit Flussmessgerät (siehe Abb. 48).

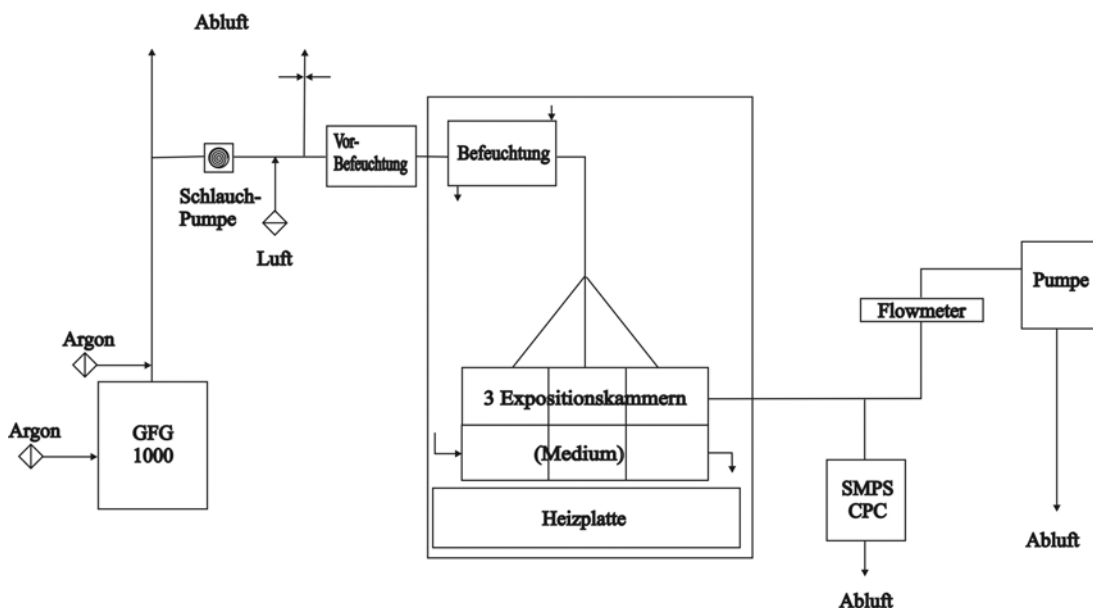


Abb. 48. Schematische Darstellung der Expositionsapparatur. GFG1000, Palas-Funkengenerator; SMPS, Scanning-Mobility-Particle-Sizer; CPC, Condensation-Particle-Counter.

Alle Bestandteile des Systems, die vor den Expositionskammern mit dem Aerosol in Kontakt kommen, müssen autoklavierbar sein. Hierzu zählen der Aerosolentnahmeschlauch des Generators und der Befeuchterkolben, sowie das Befeuchtungsrohr mit Schläuchen. Für den Mediumkreislauf sind Silikon-Pumpschläuche mit Reiter und zugehörigen Verschlüssen sowie modifizierte Laborflaschen mit Glasolive zum Schlauchanschluss dicht über dem

Boden und Schraubdeckel mit zwei Schlauchanschlüssen autoklavierbar. PALL-Filter werden für 10 h mit 25 kGray strahlensterilisiert, da sie beim Autoklavieren schmelzen. Die zugehörigen Teflonschläuche sind autoklavierbar.

### 5.2.1.1 Palas-GFG1000-Generator

Ein GFG1000-Aerosolgenerator der Firma Palas (Karlsruhe) diente in dieser Studie der Erzeugung von EC-Partikeln aus reinen Graphitelektroden (RW0, SGL Carson AG, Bonn) wie in der Literatur beschrieben (Helsper et al., 1993). Zwischen zwei Elektroden (Durchmesser 6 mm, Abstand 2 mm) wurde eine Hochspannung angelegt. Der mit einer einstellbaren Frequenz überspringende Funke erzeugte ein Plasma, aus dem primäre Kohlenstoffpartikel mit einem Argonstrom abtransportiert wurden. Funkenfrequenz und Argonverdünnung wurden so einjustiert, dass die für die Exposition von Zellen in den Expositionskammern verwendeten EC-Partikel mit denjenigen vergleichbar waren, die bereits am GSF-Institut für Inhalationsbiologie für submerse Experimente *in-vitro* und für Instillation und Inhalation *in-vivo* verwendet wurden. (Beck-Speier et al., 2003; Beck-Speier et al., 2002; Gilmour et al., 2004)

### 5.2.1.2 Verdünnungssystem

Unmittelbar nach der Generierung der Partikel wurde eine Verdünnung mit einem zusätzlichen Argonstrom als Schutzgas durchgeführt, um zu verhindern, dass an dieser Stelle Umgebungsluft in das System gelangen konnte. Dadurch wäre die Generierung gestört und die Qualität der Partikel vermindert gewesen. Zusätzlich wurden die Abstände zwischen den einzelnen Partikeln durch die Verdünnung größer und die Agglomeration reduziert. Der Argondruck betrug 2 bar, das aus reinem Argon bestehende Mischgas war auf 0,1 bar eingestellt. Der Aerosolstrom nach dem Generator betrug 6 L/min durch den Hochdruck-Argonstrom und 0,9 L/min durch den Niederdruck-Argonstrom (Mischgas).

Aus dem bereits verdünnten Aerosol wurde mittels einer Schlauchpumpe ein einstellbares Volumen Aerosol entnommen (Abb. 48); der Innendurchmesser des Schlauchs betrug 5 mm. Das Pumpvolumen betrug  $8 \text{ cm} \times (0,25 \text{ cm})^2 = 0,5 \text{ cm}^3$ . In einem weiteren Verdünnungsschritt wurde das Aerosol mit einem definierten Volumen Raumluft gemischt,

um den Argonanteil im Aerosol zu mindern. Die Partikelkonzentration im endgültigen Aerosol wurde über die Förderleistung der Schlauchpumpe reguliert. Am Aerosolausgang aus dem Verdünnungssystem wurde eine Krypton-85-Quelle zur Neutralisierung des Aerosols in den Schlauch eingelegt, um über elektrostatische Effekte eine Anlagerung von Aerosolpartikeln an den Innenseiten der Aerosolleitungen und damit den Verlust von Aerosolpartikeln zu vermindern. Dabei handelte es sich bereits um das zur Applikation verdünnte Aerosol, da in Edelgasen eine unsymmetrische Partikelladung auftritt und Ladungseffizienzen vorliegen, die sich grundlegend von denen in Luft unterscheiden (Stober et al., 1991).

### **5.2.1.3 Befeuchterstrecke**

Das generierte und verdünnte Aerosol musste zusätzlich befeuchtet werden (> 95 % Luftfeuchtigkeit), um den Bedingungen im peripheren Atemtrakt zu entsprechen. Zu diesem Zweck wurde das Aerosol zunächst zur Vorbefeuchtung in einem 100-ml-Rundkolben über eine sterile isotonische Kochsalzlösung geleitet, die mittels Thermostat auf 25 bis 30 °C temperiert worden war. Die anschließende Nachbefeuchtung erfolgte bei 37 °C in einem Glasrohr (48 cm lang, Innendurchmesser 18 mm), das mit Filterpapier ausgekleidet war und mit steriler isotonischer (= 0,9 %) Kochsalzlösung über ein Infusionsbesteck und eine Perfusionspumpe bei einer Flussrate von 6 ml/Stunde versorgt wurde.

### **5.2.1.4 Expositions-kammer und ihre Integration in den Aufbau**

Die Expositions-kammern (siehe Abb. 49) wurden in der GSF-eigenen Werkstatt hergestellt und basieren auf der Perfusionskammer von MINUCCELL (siehe 5.2). Die ursprünglichen Perfusionskammern, wie auch die unter 5.2 beschriebenen Veränderungen, wurden aus Polycarbonat gefertigt.

Die Expositions-kammer besteht aus einer Verteilereinheit für das Aerosol und drei Expositionseinheiten (Abb. 49). Die Verteilereinheit trägt zusätzlich eine Prallplatte, auf der größere partikuläre Anteile abgeschieden werden. Jede der Expositionseinheiten besteht aus einem Medium- und einem Aerosolkompartiment und einer semipermeablen Membran zur Trennung der beiden Kompartimente. Die Membran (1) ist in einen Spannring

## 5. Experimenteller Teil

---

(MINUSHEET, 2) eingespannt und trennt das Mediumkompartiment (3) vom Aerosolkompartiment (Abb. 50). Auf den Membranen werden die Epithelzellen kultiviert. Durch die Fixierklemmen (8) werden O-Ringe angepresst, so dass das System dicht verschlossen ist.

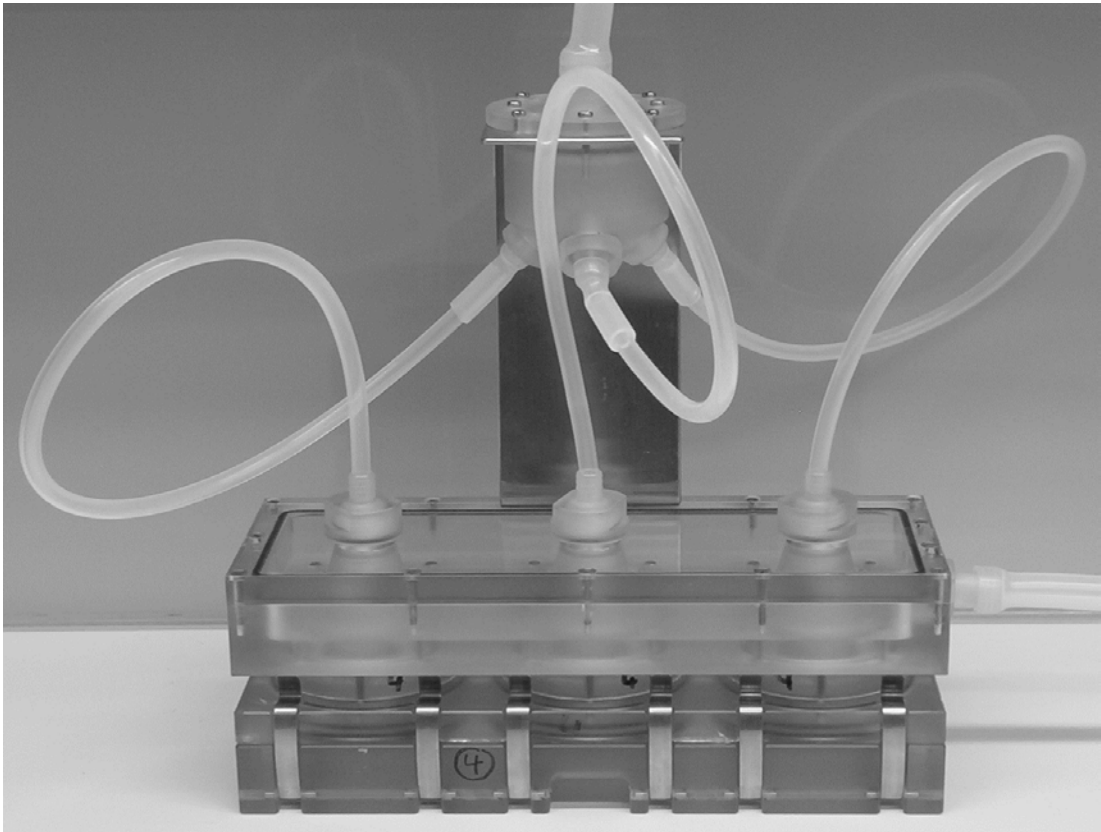


Abb. 49. Expositionskammersystem mit Verteilereinheit (oben) und drei Expositionseinheiten mit separaten Zuleitungen für das Aerosol (unten).

Die drei Aerosolkompartimente werden gleichmäßig über ihre Zuleitungen (5) mit Aerosol aus der Verteilereinheit versorgt. Die Deposition für Teilchen  $< 1 \mu\text{m}$  als Summe aus Anstrom, Sedimentation und Diffusion ist über die gesamte Membranfläche konstant. Sie beträgt für diesen Partikelgrößenbereich 2 % der Aerosolpartikel des durchgeleiteten Volumenstroms. Bei einem Volumenstrom von 250 ml pro Minute und Membran werden pro Minute sämtliche Partikel aus 5 ml Aerosolvolumen deponiert. Durch die vier Ausstromöffnungen pro Kompartiment (6) wird das Aerosol über eine Sammelkammer aus dem System gepumpt. Das Mediumkompartiment (3) wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe

gleichmäßig mit 80 ml Medium pro Stunde durchspült. Vor jeder Exposition müssen die Kammern auf Dichtigkeit überprüft werden.

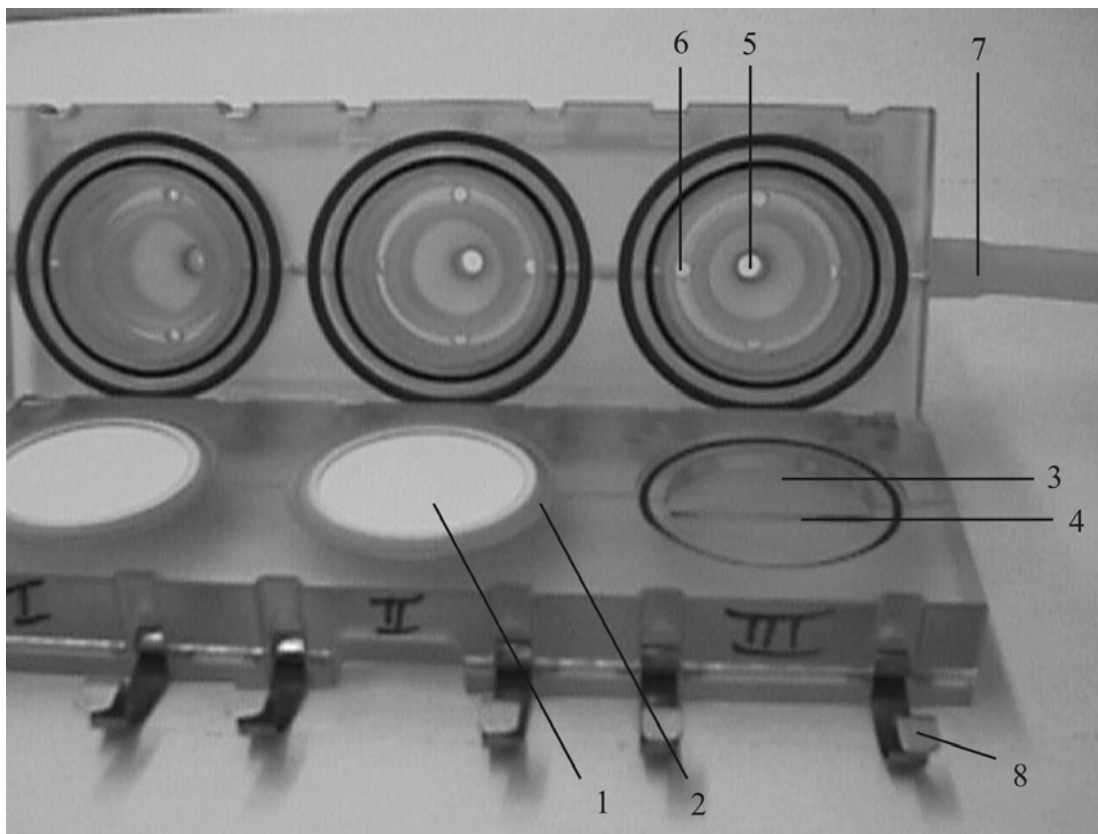


Abb. 50. Details der Expositions-kammer; 1. Anodisk-Membran, 2. Spannring (MINUSHEET, Bad Abbach), 3. Mediumkompartiment, 4. Leitung für Mediumfluss, 5. Aerosolzuleitung zum Aerosolkompartiment, 6. Aerosolableitung vom Aerosolkompartiment in die Sammelkammer, 7. Absaugschlauch der Sammelkammer, 8. Fixierklemmen.

### 5.2.1.5 Kontrollkammer

Für die Kontrollen in einer separaten Kontrollkammer wurde in einer parallelen Aerosolzuleitung die partikuläre Phase mit einem PALL-Filter entfernt und das nahezu partikelfreie Gasmisch zur Exposition von ebenfalls drei Membranen verwendet.

### 5.2.2 Vorbereitung und Durchführung eines Expositionsexperiments

#### 5.2.2.1 Vorbereitung des Expositionssystems

Am Vortag der Exposition erfolgte zunächst ein Probelauf des Partikelgenerators. Danach wurde die Generationskammer gereinigt. Zusätzlich wurden alle autoklavierbaren Aerosolleitungen zwischen dem Palas-Generator und den Expositionskammern, die im Aerosolstrom vor den Expositionskammern lagen, dampfsterilisiert. Zur Desinfektion der Expositionskammern wurden diese für 5 - 10 Minuten mit 70 % Isopropanol befüllt und anschließend im offenem Zustand unter der Laminar-Flow-Werkbank getrocknet. Das Plexiglascontainment, unter dem die Expositionskammern stehen, wurde über Nacht vorgeheizt. Vor jedem Versuchsbeginn wurde der Generator für einen Vorlauf eingeschaltet. Die Luftansaugöffnung des Verdünnungssystems wurde 2 - 3 Mal mit 70 % Isopropanol durchsprüht, um fest eingebaute Schlauchleitungen zu desinfizieren. Um die Verkeimung des Systems zu überprüfen, wurde eine Petrischale mit Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) 1 min in den Aerosolstrom des Generators (ca. 9 L/min) gehalten. Zusammen mit einer Kontrolle wurde diese Schale für mindestens 10 Tage bei 37 °C inkubiert.

Das DMEM-F12-Medium wurde entgast und anschließend mit 10 % FCS versetzt. Die Flaschen für die Mediumversorgung wurden mit 50 ml Medium befüllt und verschlossen unter die Plexiglashaube gestellt. Es bestand eine Verbindung zwischen dem Medium- und dem Aerosolkompartiment, um Druckschwankungen zu minimieren. Die Verbindung wurde durch einen 0,2- $\mu$ m-Sterilfilter ergänzt.

#### 5.2.2.2 Vorbereitung der Zellkulturen

A549-Epithelzellen wurden für die Exposition an der LMG wie im Kapitel 5.5.2 (Seite 123) beschrieben auf Anodisk-Membranen kultiviert. Wenn sich nach neun Tagen konfluente Zellschichten ausgebildet hatten, wurden insgesamt sechs Membranen unter dem Lichtmikroskop für das Expositionsexperiment in den Kammern ausgewählt, drei weitere Membranen verblieben als Kontrollen unter Submersbedingungen im Brutschrank. Die Expositionskammern wurden unter der Sterilbank mit den Zellen und dem Versorgungsmedium befüllt. Die bewachsenen Anodisk-Membranen wurden mit PBS gespült



und luftblasenfrei in die Kammer eingelegt. Die Zellschicht zeigte nach oben zur Luftseite hin. Zur Abdichtung des Systems benötigte man O-Ringe, die der Größe der Spannringe (MINUSHEETS) entsprachen und auf diese aufgelegt wurden. Letztendlich wurden die Kammern mit Fixierklemmen verschlossen und der Schlauch für die Mediumversorgung in die entsprechenden Halterungen eingelegt.

### **5.2.2.3 Exposition mit uf-EC-Partikeln**

Für die Durchführung der Exposition wurde die Partikelproduktion durch Aktivierung des Hochspannungs-Funkens gestartet. An vorgesehener Stelle des Verdünnungssystem wurde ein Sauerstoffmonitor angeschlossen, um die O<sub>2</sub>-Konzentration im Aerosol zu messen. Anschließend wurden die Kammern angeschlossen und die DC12/08NK-Vakuumpumpen (Fürgut, Tannheim) eingeschaltet. Pro Kammerblock betrug das Flussvolumen 750 ml/min. Die Flussraten waren zuvor mit Hilfe eines Bubble-Flowmeters kalibriert worden. Der ideale Vordruck, der sich durch den Durchmesser des Abluftschlauches variieren ließ, lag bei 5 - 10 Pa.

Nach erfolgter Exposition wurden Partikelproduktion und Aerosolpumpe ausgeschaltet und die Expositionskammern aus dem System entfernt. Pro Kammer wurde eine Membran für den WST1-Assay verwendet. Die zwei verbleibenden Membranen wurden in 3 ml A549-Medium eingelegt. Nachfolgend wurde eine Membran pro Kammer mit 30 ng/ml TNF für 1 h nachstimuliert. Auch eine submerse Kontrolle aus dem Brutschrank wurde für 1 h mit TNF stimuliert. Für die Polymerasekettenreaktion stand nach der Exposition mit Nachinkubation ein Set mit 6 Proben zur Verfügung:

1. Submerse Kontrolle (= Kontrolle submers),
2. mit TNF stimulierte submers Kontrolle (= TNF submers),
3. Kammerkontrolle (= Kontrolle),
4. mit TNF stimulierte Kammerkontrolle (= TNF),
5. mit EC exponierte Membran (= EC),
6. mit EC exponierte Membran in Kombination mit TNF-Stimulation (= EC + TNF).

### 5.2.3 Einstellungen

Mithilfe einer Tabelle wurden in jedem Experiment die wichtigsten Einstellungen dokumentiert:

1. Zeitpunkt,
2. Argondruck (bar),
3. Erste Verdünnung (Skt),
4. Zweite Verdünnung (Skt),
5. Vordruck (Pa),
6. Temperatur des Wasserbads der Vorbefeuchtung (°C),
7. Temperatur unter dem Plexiglascontainment (°C),
8. Temperatur des Aerosols der Kontrollstrecke (°C),
9. Relative Feuchte des Aerosols der Kontrollstrecke (°C),
10. Temperatur des Aerosols der EC-Strecke (°C),
11. Relative Feuchte des Aerosols der EC-Strecke (°C),
12. Partikelkonzentration (Partikel/cm<sup>3</sup>),
13. Partikeldurchmesser (CMD, in nm),
14. Flussrate Kontrollstrecke (Skt),
15. Flussrate EC-Strecke (Skt).

#### 5.2.3.1 Monitoring

In 15 - 30-minütigen Abständen wurden die im Kapitel 5.2.3 aufgeführten Parameter überprüft.

### 5.3 Größenverteilung und Konzentration der luftgetragenen EC-Partikel im Expositionssystem

Insbesondere ultrafeine Teilchen gelangen nach Inhalation bis in die tiefen alveolären Regionen, wo sie mit dem Epithel in Wechselwirkung treten können. Aus diesem Grund sollten die mit dem Palas-GFG1000-Generator erzeugten Kohlenstoffpartikel einen CMD von 100 nm nicht wesentlich überschreiten.

Zur Bestimmung der Partikelgröße wurde ein SMPS 3080 verwendet, der mit einem CPC 3025 verbunden war. Mit einer Rate von 300 ml/min wurde das Aerosol von einer Pumpe in den SMPS gesaugt, dort mit einem DMA in Größenfraktionen getrennt und einzeln im Kondensationskernzähler vermessen. Die Daten wurden aufgezeichnet und für jedes Einzelerperiment nach der Anzahlkonzentration/ Zeit, dem Durchmesser/ Zeit, sowie der Anzahlkonzentration/ Durchmesser und der Massenkonzentration/ Durchmesser ausgewertet (siehe Kapitel 2.3). Die Steuerung übernahm das Programm „Aerosol Instrument Manager“, welches wie folgt eingestellt wurde (Tab. 23).

Tab. 23. Steuerung des SMPS 3080 mit dem Programm „Aerosol Instrument Manager“.

SMPS-Steuerung	
DMA 3081	
Impaktor-Typus	0,0508 cm
CPC 3025	niedriger Fluss
DMA-Flussrate	Mantel-Fluss: 3,0 L/min; Aerosol-Fluss: 0,3 L/min
Messintervalle	alle 5 min
Physikalische Eigenschaften:	
Dichte	1,000 g/cm <sup>3</sup>
Korrektur bei Mehrfachladungen	an

Die Kalibration des SMPS erfolgte in regelmäßigen Abständen. Hierfür wurden Suspensionen von Latexpartikeln mit Partikelgrößen von 79 und 300 nm eingesetzt.

Folgende Kenndaten wurden aufgezeichnet:

1. Medianer Durchmesser der Partikelgrößenverteilung (CMD),
2. Teilchenkonzentration,
3. geometrische Standardabweichung,
4. medianer Massendurchmesser (MMD),
5. Massenkonzentration.

Durch die Einstellung der Funkenfrequenz am Generator konnte der CMD der Partikel variiert werden. Um zu untersuchen, wie sich die Partikeleigenschaften beim Durchlaufen des Systems verhalten, wurden an bis zu vier Messpunkten Partikelspektren aufgezeichnet.

Für das zu erzeugende Kohlenstoffaerosol wurde die Funkenfrequenz des Generators zwischen 30 und 240 Hz variiert. Für die Berechnung der Partikelmassen mit dem SMPS wurde zunächst eine Dichte von  $1 \text{ g/cm}^3$  angenommen.

Zur Generierung der luftgetragenen uf-EC-Partikel wurde eine Funkenfrequenz von 240 Hz gewählt. Mit dieser Einstellung waren zuvor die für Stimulationen unter submersen Bedingungen verwendeten uf-EC-Partikel generiert worden. Da für die Kammerexperimente jedoch viel geringere Partikelzahlen pro  $\text{cm}^3$  erforderlich waren, als sie bei 240 Hz generiert wurden, wurde für die Aerosolcharakterisierung teilweise mit kleineren Frequenzen (30 Hz und 60 Hz) gearbeitet, was die Lebensdauer der Graphitelektroden erhöhte und störende Aerosolablagerungen verminderte.

Von dem für die Kammerexperimente verwendeten Aerosol wurde die Konzentration und die Größe der Partikel untersucht. Die Messungen wurden sowohl vor, als auch nach der Expositionskammer durchgeführt. Zusätzlich wurden die Temperatur der Vorbefeuchtung und die Temperatur unter der Plexiglashaube auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht, so dass die Temperatur des Aerosols nach der Kammer  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  betrug und 95 - 100 % relative Feuchte aufwies.

Um die Effizienz des eingesetzten PALL-Filters zu belegen, wurden Partikelkonzentrationen in der Kontrollstrecke im Vergleich zur EC-Strecke gemessen. Der Filter wurde vorher, wie bei den Kammerversuchen, zur Sterilisation mit 25 kGray bestrahlt.

Der letzte Ansatz befasste sich mit Aerosolen, die mit einer Funkenfrequenz von 30 Hz generiert wurden. Bei gleichen Argonflüssen sollte hierbei die mittlere Partikelgröße im Vergleich zur Generierung mit 60 Hz und 240 Hz sinken.

### **5.4 Temperatur des Aerosols**

Für viele Zellfunktionen spielt die Temperatur, bei der die Zellen kultiviert werden, eine wichtige Rolle. Angestrebt wurde eine Temperatur, die dem physiologischen Wert entspricht. Problematisch ist es, wenn die experimentelle Temperatur die physiologische Temperatur übersteigt, da in diesem Fall bestimmte Proteine (HeatShock-Proteine) vermehrt gebildet werden, um die Zelle zu schützen.

Die Temperatur wurde daher mit einem Messfühler direkt nach dem Austritt des Aerosols aus den Expositionskammern zusammen mit der relativen Feuchte gemessen und während der Kammerversuche in gleichmäßigen Abständen aufgezeichnet.

### **5.5 Kultivierung und Exposition von A549-Zellen**

A549-Zellen sind humane alveoläre Epithelzellen vom Typ-II. Es handelt sich um eine häufig verwendete Zelllinie, die aus der Kultur eines Explantats von Karzinomgewebe eines 58-jährigen Mannes entwickelt wurde. Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (250 ml Flaschen), bei einer Verdopplungszeit von ca. 18 h (Croce et al., 1999); pro Flasche wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 20 ml Medium ausgesät. Das A549-Medium bestand aus einer 1:1-Mischung von D-MEM und F12 mit Glutamin und war mit 10 % fötalem Kälberserum und 5 ml Penicillin-Streptomycin pro 500 ml substituiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und alle 3 - 4 Tage passagiert.

Die Exposition der A549-Zellen erfolgte sowohl unter submersen Bedingungen als auch an der LMG nach dem in Abb. 51 gezeigten Studiendesign.

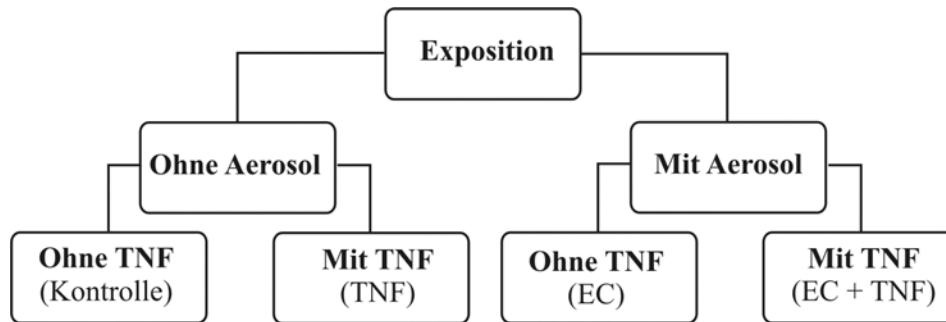


Abb. 51. Studiendesign für die Exposition von A549-Zellen mit EC-Partikeln. Zellen der TNF- oder (EC + TNF)-Probe wurden 1 h mit 30 ng/ml TNF nachstimuliert.

### 5.5.1 Submerse Expositionen

Für Expositionen von submersen Kulturen mit suspendierten Partikeln wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  A549-Medium in Zellkulturplatten (Costar, Bodenheim) mit 24 Vertiefungen ( $1,9 \text{ cm}^2$  pro Vertiefung) ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von 18 Stunden wurden die Zellen für 2 Stunden mit 1 - 100  $\mu\text{g}$  EC-Partikeln/ml exponiert (Abb. 52 A).

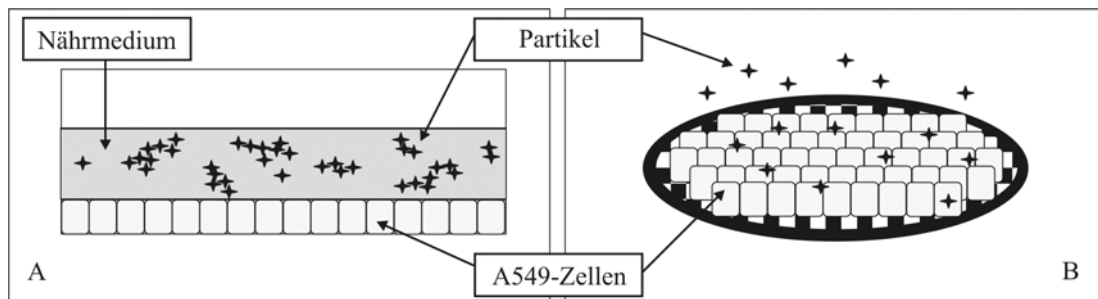


Abb. 52. Exposition von A549-Zellen unter submersen Bedingungen (A) und an der LMG (B) (die Mediumversorgung von der basalen Seite ist in (B) nicht eingezeichnet).

Zur Herstellung einer homogenen Partikelsuspension in destilliertem Wasser erfolgte eine Behandlung mit Ultraschall (3 x 15 s) und anschließendes Schütteln (1 min). Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Unmittelbar danach wurde A549-Medium im Verhältnis 1:1 zugesetzt und die Zellen sofort mit der frisch hergestellten Suspension inkubiert. Bei den Kontrollen erfolgte ein Volumenausgleich mit einem 1:1 Wasser:Medium-Gemisch. Die Nachstimulation erfolgte mit 30 ng/ml TNF für 1 Stunde.

### 5.5.2 Expositionen an der Luft-Medium-Grenzschicht

Für Expositionen mit ultrafeinen „elemental carbon“ (uf-EC)-Partikeln an der LMG wurden die Zellen auf semipermeable Membranen (47 mm Durchmesser) aus Aluminiumoxid, den Anodisk-Membranen, ausgesät. Diese haben am Rand einen Trägerring, der es ermöglicht, sie in einen Polycarbonatring mit einem zugehörigen Spannring (MINUSHEET) einzubringen. In eine 100 x 15-cm-Zellkulturschale wurden 10 ml A549-Medium pipettiert und je eine Anodisk-Membran in MINUSHEET eingelegt, wobei auf die Vermeidung von Luftblasen unter der Membran geachtet wurde. Auf jede Anodisk-Membran wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von zwei Stunden wurden die Zellen neun Tage unter submersen Bedingungen kultiviert, wobei alle drei bis vier Tage 10 ml des A549-Mediums ausgetauscht wurde. Zur Exposition wurden die Membranen mit konfluenten Monolagen in die Expositionskammern eingebracht, von der basolateralen Seite mit Medium versorgt und von der apikalen Seite mit den luftgetragenen Partikeln exponiert (Abb. 52 B).

### 5.6 Fluoreszenzmarkierung der Zytoskelettkomponenten der A549-Zellen

Um die Zellschicht näher zu charakterisieren, wurden Actin (Mikrofilamente) sowie  $\beta$ -Tubulin (Mikrotubuli) von A549-Zellen nach submerser Kultivierung auf Anodisk-Membranen wie folgt mit Antikörpern markiert: Die Zellen wurden mit 4 %iger frisch hergestellter Formaldehyd-Lösung für 30 min fixiert. Hierfür wurden 2 g Paraformaldehyd in 10 ml deionisiertem Wasser unter ständigem Rühren in einem Wasserbad 30 min auf 70 °C erhitzt. Danach wurden 2 - 4 Tropfen 1 M NaOH-Lösung unter weiterem Rühren zugegeben, bis die Formaldehyd-Lösung klar wurde. Nach dem Abkühlen wurde die 20 % Stammlösung bis zum Erreichen der Endkonzentration zu PBS-Puffer gegeben und die 4 % Formaldehyd-Lösung sofort verwendet. Danach wurden die Anodisk-Membranen in PBS-Puffer gelegt und bei 4 °C gelagert. Vor der Markierung wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS, das mit 0,1 % Triton X-100 versetzt wurde (Waschpuffer), gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine zehnminütige Inkubation mit Abdil-Puffer blockiert. Für die Markierung wurden bei 37 °C pro Membran je 10  $\mu$ l monoklonale Antikörpern gegen Actin und  $\beta$ -Tubulin in 1,990 ml Abdil-Puffer verwendet. Nach zweimaligem Waschen (5 min) mit dem Waschpuffer wurde zusätzlich zweimal mit Abdil-Puffer gewaschen (5 min)

und die Membranen nacheinander für 30 min bei 37 °C mit 100 µl sekundärem, mit FITC-konjugiertem Antikörper in 1,9 ml Abdil-Puffer inkubiert. Es folgten vier weitere fünfminütige Waschschrte mit Waschpuffer. Die Zellkerne wurden für 10 min bei 37 °C mit Hoechst 33258 angefärbt. Die Zellen wurden viermal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS-Puffer (je 5 min) gewaschen. Die Anodisk-Membranen wurden mit einem Skalpell in 5 Teile geschnitten und mit Prolong Antifade auf einem Objektträger montiert.

Die Präparate wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena) untersucht und als tif-Bilddatei dokumentiert.

### **5.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Im Unterschied zur konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet man bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie einen Laserstrahl zur Anregung. Der Laserstrahl (Argon-Laser, 288 nm) wird fokussiert, so dass er einen kleinen Objektbereich ausleuchtet. Das von diesem Bereich ausgehende Streulicht wird mit einem Strahlenteiler separiert, um nach Durchquerung einer kleinen als Raumfilter wirkenden Blende von einem optischen Detektor nachgewiesen zu werden. Durch die Punkt-zu-Punkt-Abbildung dieser konfokalen Anordnung erreicht man, dass die Probenbereiche vor oder hinter dem Fokus praktisch nicht zum Signal beitragen. Das Laser-Scanning-Mikroskop zeigt daher nur die Strukturen, die in der Fokusebene liegen; auf diese Art können „optische Schnitte“ erzeugt werden. Wenn diese Schnitte durch die Oberfläche eines unebenen Objektes verlaufen, erscheinen nur bestimmte Höhenbereiche. Die Aneinanderreihung solcher Bilder liefert ein tiefenscharfes Bild. Mit dieser Methode wurde an den A549-Zellen auf Anodisk-Membranen nach mehrtägiger Kultur unter submersen Bedingungen überprüft, (a) ob sich bereits eine dichte Zellschicht gebildet hatte und (b) ob die Zellen noch als Monolage wuchsen.

### **5.8 Messung des spezifischen transepithelialen elektrischen Widerstands**

Wenn Epithelzellen auf einem porösen Filter eine dichte Barriere bilden, erhöht sich der TEER zwischen dem basolateralen und dem apikalen Kompartiment. Die konfluenten Zellen sind untereinander eng verknüpft und behindern so Ionenströme über die Membran hinweg von der basolateralen zur apikalen Flüssigkeit und umgekehrt. Diese Behinderung des



Ladungstransports und somit die funktionelle Integrität der Zelllage kann mit zwei Elektroden, die mit den Flüssigkeiten in Kontakt stehen, gemessen werden. Für diese Messungen wurde ein umgebautes EVOM (Epithelial Volttohmmeter, WPI, Berlin) verwendet, das an die Abmessungen der Anodisk-Membranen angepasst wurde.

### **5.9 Messung der Viabilität von A549-Zellen an der Luft-Medium-Grenzschicht**

A549-Zellen werden normalerweise unter submersen Bedingungen kultiviert. *In-vivo* werden Epithelzellen der Lunge jedoch nur von der basolateralen Seite mit Nährstoffen versorgt. Apikal stehen sie in Kontakt mit der eingeatmeten Luft. Für Expositionen an der LMG sollte die Viabilität der A549-Zellen im Vergleich zu submers kultivierten Zellen geprüft werden. Bei der Viabilitätsbestimmung mit WST1 wird durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, das zur Atmungskette der Mitochondrien gehört, das Tetrazolium-Salz WST1 oder 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat in ein Formazan umgewandelt (Cook and Mitchell, 1989; Knebel et al., 1998).

Die Durchführung des WST1-Assays erfolgte mit A549-Zellen auf Anodisk-Membranen nach 6-stündiger Exposition mit Partikeln an der LMG, sowie mit Kontrollzellen nach entsprechender 6-stündiger Exposition mit gefiltertem Aerosol. Als weitere Kontrollen dienten submers ebenfalls auf Anodisk-Membranen kultivierte A549-Zellen. Für die Analyse wurden die Anodisk-Membranen aus den Spannringen herausgenommen und in 60 x 15-mm-Zellkulturschalen mit drei Milliliter A549-Medium eingelegt. Eine weitere Zellkulturschale mit drei Milliliter A549-Medium diente als Leerwert. Zeitgleich wurden in jede Schale 300 µl des WST1-Reagenzes zugegeben. Nach 1, 2, 5, 7 und 23 min Inkubation wurden die Zellkulturschalen jeweils eine Minute geschüttelt und je 700 µl entnommen und danach auf Eis gestellt. Der Farbumschlag wurde am Spektralphotometer bei  $\lambda = 450$  und 630 nm gemessen. Die Referenzabsorption bei 630 nm wurde von der Absorption bei 450 nm abgezogen. Der Wert der submersen Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt und die Viabilität der A549-Zellen an der LMG als Mittelwert aus drei Messungen, nach 5, 7, und 23 min, ohne bzw. mit Partikelexposition aufgetragen.

Die durch Trypanblau bestimmbare Viabilität der Zellen beruht auf der Integrität der Zellmembranen und ist im Kapitel 5.11.1 näher beschrieben.

### **5.10 Genexpressions-Arrays**

Die Exposition von Zellen oder Gewebe mit umweltrelevanten Partikeln oder Modellaerosolen kann in den betroffenen Zielzellen zu einer veränderten Expression von Genen führen. Der Genexpressions-Array ist eine weit verbreitete Methode zum Screening von Genexpressionsänderungen in Zellmaterial. Wenn im Zellkern ein Gen verstärkt abgelesen wird, führt das zu verstärkter Transkription der korrespondierenden m-RNA. Diese Nukleinsäure wird aus dem Zellkern heraus ins Zytoplasma transportiert; hier findet die Translation in Proteine statt. Isoliert man die m-RNA aus der Zelle, kann man Genexpressionsunterschiede quantifizieren. Soweit regulatorische Gene betroffen sind, können über die dadurch bedingte Beeinflussung von Signaltransduktionswegen messbare physiologische oder pathophysiologische Veränderungen induziert werden.

Mit der Expressions-Array-Technik kann das Expressionsmuster einer großen Anzahl von Genen auf der m-RNA-Ebene erfasst werden. Grundsätzlich liefern expositionsbedingte Veränderungen in der Expression wichtiger Gene erste Ansatzpunkte zur Identifizierung der an der Reaktion beteiligten Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster in der humanen epithelialen Zelllinie A549 als Modelltarget untersucht. Um Änderungen der Genexpression durch die Exposition erkennen zu können, wurden gleichzeitig unbehandelte Kontrollen, sowie Positivkontrollen nach Stimulation mit TNF als inflammatorisches Zytokin analysiert.

#### **5.10.1 Clontech-Atlas-Array**

Für den ersten Teil der Experimente wurde ein c-DNA-Expressionsarray, der Atlas-Human-1.2-Array (Clontech, Heidelberg), verwendet. Die Durchführung des Versuchs erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers mit einigen Modifikationen.

In einem Ansatz an der LMG wurden A549-Zellen auf Anodisk-Membranen für 6 h mit EC-Partikeln nach dem in Abb. 51 gezeigten Studiendesign exponiert. Für die Exposition der Zellen mit EC-Partikeln wurde eine Dosis gewählt, die als MID-DOSE bezeichnet wurde.

### 5.10.1.1 Erste RNA-Isolierung

Nach der Exposition wurden die Zellen wie in Kapitel 5.11.1 beschrieben von den Anodisk-Membranen abgelöst und zunächst mit kalter PBS-Lösung gewaschen. Sie wurden dann in 10 ml kalter Zell-Denaturierungslösung aufgeschlossen und die Lösung dreimal mit einer 10 ml Spritze durch eine 18 Gauge-Kanüle gezogen. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung zur Entfernung grober Zelltrümmer abzentrifugiert (3.500 g, 2 °C, 20 min) und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 10 ml gesättigte Phenollösung zugegeben, gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zugabe von 1,8 ml Chloroform wurde wieder wie oben gemischt und auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (3.500 g, 2 °C, 20 min) wurde der Überstand, ohne die untere, organische Phase zu berühren, in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der beschriebene Reinigungsschritt wurde mit 4,8 ml Phenollösung und 1,8 ml Chloroform wiederholt.

Unter ständigem Mischen wurde in kleinen Anteilen 20 ml kaltes Isopropanol zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (3.500 g, 2 °C, 60 min) und der Überstand abpipettiert. Das verbliebene RNA-Pellet wurde mit 3 ml Ethanol (80 %) gewaschen, der Alkohol nach erneuter zehnmütiger Zentrifugation wieder entfernt und das RNA-Pellet 10 min luftgetrocknet. Die RNA wurde in 300 µl Reinstwasser gelöst und mittels Absorptionsmessung bei  $\lambda = 260$  nm und 280 nm der RNA-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt (2 µl RNA in 398 µl O.D.-Messpuffer). Die Lagerung erfolgte bei  $-80$  °C.

### 5.10.1.2 Reinheitsbestimmung

In einem denaturierenden Agarose/Formaldehyd/Ethidiumbromid-Gel wurden je Probe 2 µg RNA in 10 µl Ladepuffer aufgetragen und mit MOPS-Laufpuffer bei 75 Volt ca. 1,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI aufgetragen. Bei unverdauten, reinen RNA-Proben sollten zwei scharfe Banden bei 4,5 kbp für den 28S-Teil und 1,9 kbp für den 18S-Teil der r-RNA auftauchen. Das Verhältnis von 28S- zu 18S-r-RNA soll im Bereich von 1,5 bis 2,5:1 liegen. Das Experiment wurde nur mit reiner und unverdauter RNA fortgesetzt.

### 5.10.1.3 DNase-I-Verdau

Die RNA-Proben konnten zu diesem Zeitpunkt noch Verunreinigungen mit DNA enthalten. Diese mussten entfernt werden, um sicherzustellen, dass die reverse Transkription der RNA in c-DNA nicht durch genomische DNA (g-DNA) kompetitiv gehemmt wurde. Deshalb wurde ein DNase-I-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 300 bis 350 µg RNA jeder Probe in einem Volumen von 80 µl in einem Gemisch von 125 µl Reinstwasser, 24 µl DNase-I-Puffer, 1,2 µl DNase-I (10 U/µl) und 10 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) eine Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert und die Reaktion anschließend mit 24 µl 10 x Terminationsmix gestoppt.

### 5.10.1.4 Zweite RNA-Isolierung

Zur erneuten Isolierung und Aufreinigung der RNA wurde zu jeder Probe 140 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert (14.000 rpm, RT, 10 min). Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgehoben, ohne die untere organische Phase zu berühren und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt; dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zum abgenommenen Überstand wurden 140 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) pipettiert, gemischt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 24 µl Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M) und 360 µl Ethanol (96 %) wurde gut gemischt und zentrifugiert (14.000 rpm, RT, 20 min). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte RNA mit 80 %igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet circa 10 min luftgetrocknet und in 40 µl Reinstwasser aufgenommen.

### 5.10.1.5 Prüfung der RNA auf DNA-Kontamination durch PCR

Um den Erfolg des DNase-I-Verdau zu überprüfen, wurde mit der RNA als Vorlage ohne reverse Transkription eine PCR durchgeführt. Die Probe darf keine g-DNA mehr enthalten. Als Primer wurde ein gut charakterisiertes Gen, die GAPDH gewählt, die als Housekeeping-Gen in allen Zellen in konstant hoher Rate exprimiert wird. Die Primer wurden so gewählt, dass sie innerhalb und zu Anfang eines Exon-Stückes des GAPDH-Genes lagen

und nicht von einer Exon-Intron-Grenze unterbrochen wurden (Primersequenz unter Kapitel 5.11.5.2, Seite 143).

Jede Probe wurde in vier PCR-Ansätzen überprüft:

1. Ansatz mit der zu prüfenden RNA,
2. Ansatz mit Reinstwasser als Negativkontrolle,
3. Ansatz mit g-DNA als Positivkontrolle,
4. Ansatz mit RNA und g-DNA.

Der letzte PCR-Ansatz diente zur Abschätzung, ob RNA die erfolgreiche Amplifikation von vorhandener g-DNA durch kompetitive Hemmung unterdrückt. Bei RNA-Proben, die frei von g-DNA sind, erwartet man nur in Ansatz 3 und 4 eine erfolgreiche Amplifikation von GAPDH.

Für die PCR wurde 1 µg RNA und 1 µg g-DNA eingesetzt. Zu den PCR-Ansätzen 1 und 4 wurde 4 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) zugegeben und das Gesamtvolumen mit Reinstwasser auf 8 µl aufgefüllt. Jeder Ansatz wurde durch 10 µl Verdünnungs-Puffer und 80 µl Amplifikationsmix ergänzt und anschließend mit 60 µl Mineralöl überschichtet. Das Amplifikationsprofil für GAPDH ist in Tab. 24 aufgeführt.

Die Analyse der amplifizierten DNA-Stücke erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel mit 0,5 x TBE-Laufpuffer und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid. Pro Probetasche wurden 10 µl Probe und 2 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI (0,15 - 2,1 kbp) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 60 bis 90 min bei 150 Volt und wurde danach mit einem Polaroid-Film (Polapan, 9 x 12 mm) unter UV-Beleuchtung fotografiert.

Tab. 24. Amplifikationsprofil für GAPDH am Thermocycler.

Vorgang	Zahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
Denaturierung	1	94	240
Amplifikation	40	94	30
		60	40
		72	40
Denaturierung	1	72	300

### 5.10.1.6 Reverse Transkription in c-DNA mit radioaktiver Markierung

Für die reverse Transkription wurden je Probe 5 µg der gereinigten RNA in 2 µl Volumen eingesetzt. Dazu wurden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß 1 µl vom 10-fachen CDS-Primer-Mix pipettiert, gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach zweiminütiger Inkubation im Heizblock bei 70 °C wurden die Ansätze weitere 2 min bei 48 °C inkubiert und danach je 8 µl Mastermix hinzugegeben. Der Mastermix hatte folgende Zusammensetzung:

2,0 µl	5 x Reaktionspuffer
1,0 µl	10 x dNTP-Mix
3,5 µl	[α- <sup>32</sup> P] dATP (3.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)
0,5 µl	DTT (100 mM)
1,0 µl	MMLV-Reverse-Transkriptase (50 U/µl)

Nach gutem Durchmischen wurde die Probe 25 min bei 48 °C im Heizblock inkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von 10 x RT-Terminationsmix gestoppt. Um die Probe von nicht eingebauten Nukleotiden zu befreien, wurde die nun radioaktiv markierte c-DNA-Probe auf Chroma-Spin-200-Säulchen aufgetragen und sechs Fraktionen zu je 100 µl gesammelt (Elutionsmittel Reinstwasser). Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden im Szintillationszähler (Packard) gemessen und ein Elutionsprofil erstellt. Die radioaktiv markierte c-DNA wird meist mit den Fraktionen 2 und 3 eluiert, die freien Nukleotide später (Fraktionen 5 und 6). Die beiden Fraktionen mit dem höchsten c-DNA-Peak wurden

zusammenpipettiert. Für eine erfolgreiche Markierung musste die Probe eine Aktivität von  $10^6$  bis  $10^7$  Zerfälle pro Minute aufweisen.

Die meisten der in der reversen Transkription und in der folgenden Hybridisierung verwendeten Reagenzien sind im Clontech-Human-1.2-Kit enthalten (siehe 5.1.3, Seite 103).

#### **5.10.1.7 Hybridisierung auf den Clontech-Nylon-Membranen**

Für jede Probe wurde eine Nylon-Membran mit Reinstwasser benetzt und in Hybridisierungsflaschen eingelegt. Ohne die Membranen trocknen zu lassen, wurde 10 ml ExpressHyb-Hybridisierungslösung, die mit 100 µg/ml Lachs-Sperma-DNA (vor Gebrauch mit 18 Gauge-Nadel scheren) supplementiert war, eingefüllt und die sich drehenden Flaschen (ständige und gleichmäßige Benetzung der Membranen) im Hybridisierungsöfen 30 min bei 68 °C inkubiert. Die radioaktiv markierten c-DNA-Proben (200 µl Volumen) wurden mit 22 µl 10 x DNA-Denaturierungslösung versetzt, gut gemischt und 20 min bei 68 °C im Heizblock inkubiert. 5 µl c<sub>0</sub>t-1-DNA und 225 µl 2 x Neutralisierungslösung wurden zugegeben, gut gemischt und die Probe weitere 10 min bei 68 °C inkubiert. Diese c-DNA-Probe wurde zu 5 ml ExpressHyb-Lachs-Sperma-DNA-Mischung gegeben und nach dem Verwerfen der alten Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsflaschen gefüllt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 68 °C durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und zum Waschen der Nylon-Membranen 200 ml der auf 68 °C vorgewärmten Waschlösung-I zugegeben. Die Membranen wurden von den Flaschen in einen Waschtrog überführt und dreimal mit Waschlösung-I, dann zweimal mit Waschlösung-II bei 68 °C jeweils 30 min gewaschen. Nach einem abschließenden Waschschrift in 2 x SSC-Lösung für 5 min bei RT wurden die Membranen in dünne Kunststoff-Folien eingeschweißt und in Filmkassetten mit Verstärkerfolie (Biomax-MS-Screen, Kodak, Stuttgart) auf Biomax-MS-Film (Kodak, Stuttgart) bei -80 °C exponiert. Um sowohl schwach, als auch stark exprimierte Gene detektieren zu können, wurden drei unterschiedliche Expositionszeiten (einen Tag, drei und acht Tage) gewählt. Die Schwärzungen zeigten auf den Röntgenfilmen solche Positionen an, die radioaktive c-DNA gebunden hatten. Mit einem Grid wurden sie den entsprechenden Genen zugeordnet.

Nach Abschluss des Experiments kann durch „Strippen“, d.h. Abwaschen der c-DNA der einzelnen Proben, die Membran gereinigt und anschließend wiederverwendet werden.

### **5.10.1.8 Auswertung der Clontech-Daten**

Die Schwärzung des Films war ein Maß für die Expression des entsprechenden Gens. Die Expressionsmuster von EC und (EC + TNF) wurden mit dem Expressionsmuster der zugehörigen Kontrolle (Kontrolle oder TNF-Kontrolle) verglichen. So konnte bestimmt werden, ob sich die Expression eines gegebenen Gens verändert, d.h. verstärkt oder abgeschwächt hat. Dazu wurden die exponierten Röntgenfilme mit 300 dpi im Durchlichtmodus eingescannt (Agfa-Snapscan-1236 mit Durchlichteinheit, Software ScanWise Version 1.20, Agfa, Köln). Die densitometrische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm Atlas-Image Version 1.01 (Clontech, Heidelberg) mit den Einstellungen „background-based threshold“: 200 %, „linear image contrast“, „ratio threshold“: 2,0 % und „difference threshold“: 5.000 durchgeführt. Als Basis für die Normierung der einzelnen densitometrischen Daten dienten sechs als Kontrolle aufgetragene konstitutionell exprimierte Gene (Housekeeping-Gene). Die Bilder der Nylonmembranen wurden mit Hilfe von Ankerpunkten und den Housekeeping-Genen in ein Raster eingepasst; jede Schwärzung wurde genau justiert. Dies erwies sich als notwendig, da es sich bei den verwendeten Membranen nicht, wie bei Glas- oder Plastik-Chips, um starre Träger handelt. Die Schwärzungen konnten je nach Lage der Membran verschoben sein.

### **5.10.2 Affymetrix-GeneChips**

Im Unterschied zum Clontech-Array handelt es sich bei dem GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) um einen Array, der auf eine Glasfläche gespottet ist. Dadurch können die Spots sehr viel enger nebeneinander aufgetragen werden, so dass auf dem verwendeten HG-U133A-Chip insgesamt 18462 „Probe Sets“ aufgebracht sind. Für jede Sonde einer Gensequenz („Perfect Match“) wird eine zusätzliche Negativkontrolle („Mismatch“) eingesetzt („Probe Pairs“). Auf dem GeneChip HG-U133A sind meist 11 solcher „Probe Pairs“ pro „Probe Set“ vorhanden.



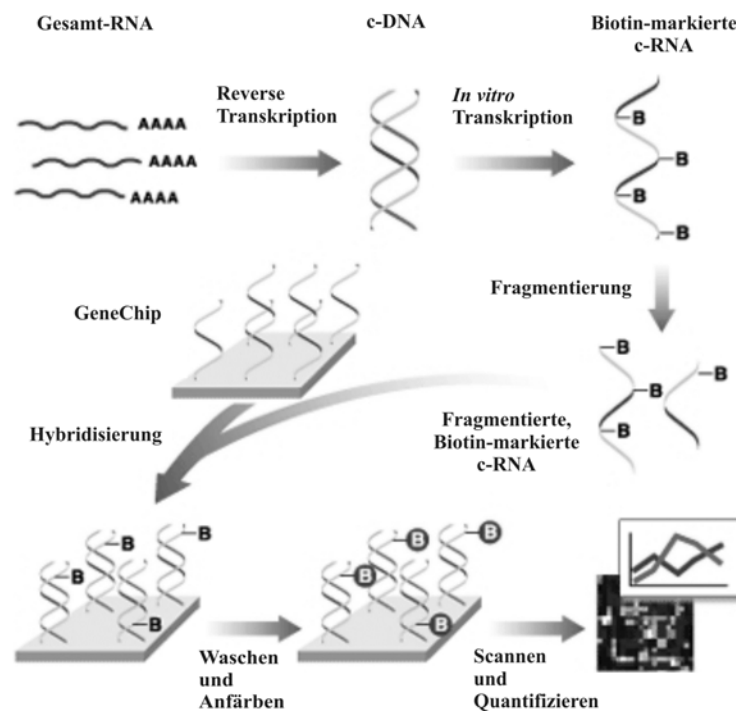


Abb. 53. Darstellung der Arbeitsschritte bei einer Affymetrix-GeneChip-Analyse, modifiziert nach [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com).

Ein weiterer Unterschied besteht in der Art der verwendeten Sonden. Beim Clontech-Array werden fertige 200 - 600 Basenpaare lange c-DNA-Stränge auf der Membran fixiert. Ein Spot auf einem Affymetrix-GeneChip ist dagegen 25 Basenpaare lang und wird mit einer fotolithographischen Methode direkt auf dem GeneChip synthetisiert. Diese Art von Arrays nennt man auch Oligonukleotid-Array. Im Gegensatz zum radioaktiv gelabelten Clontech-Array erfolgt die Detektion der Hybridisierung beim Affymetrix-GeneChip mittels Fluoreszenz. Der Ablauf des GeneChip-Experiments ist schematisch in Abb. 53 dargestellt.

Für den zweiten Teil der Array-Experimente nach den Clontech-Arrays wurden Affymetrix-GeneChips mit gepoolten Zellen aus drei Kammerversuchen durchgeführt. Während beim Clontech-Array für die Exposition mit EC-Partikeln eine MID-DOSE-Konzentration gewählt worden war, wurden für die GeneChips jeweils drei Expositionen im LOW-DOSE- und HIGH-DOSE-Bereich durchgeführt. Bei den LOW-DOSE-GeneChips wurden  $2 \times 10^6$  Zellen aus einem Experiment verwendet, bei den HIGH-DOSE-GeneChips  $1,5 \times 10^6$ . Nach der Zellzählung wurden entsprechende Volumina der Zellsuspension in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert und die Überstände nach Zentrifugation ( $400 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 6 min) abgenommen. Die Zellen der einzelnen Proben wurden in  $350 \text{ }\mu\text{l}$  RLT-Puffer aufgenommen,

mit der Pipette resuspendiert und 1 min gut gemischt. Die gepoolten Zellen aus drei LOW-DOSE-Experimenten und aus drei HIGH-DOSE-Ansätzen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die GeneChip-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. R. Geffers (Array Facility, GBF, Braunschweig) durchgeführt.

### **5.10.2.1 Erste RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierungen für die Affymetrix-GeneChips wurden mit RNeasy-Säulen von Qiagen durchgeführt. Das Volumen der Probe wurde durch dasselbe Volumen 70 % Ethanol ergänzt und mit der Pipette resuspendiert. Bei geschlossenem Deckel wurde die Säule 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert; die Lösung wurde erneut auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Flüssigkeit danach verworfen.

Zum Waschen wurde 700  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer, der durch Zentrifugation (15 s, 10.000 rpm) entfernt wurde. Um die Säule zu trocknen, wurde sie nach einer erneuten Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm). Die Eluierung erfolgte mit 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser, das direkt auf die Silika-Gel-Membran der Säule pipettiert wurde und nach 3 min abzentrifugiert (1 min, 10.000 rpm) wurde. Die Präzipitation der RNA aus der wässrigen Eluat erfolgte nach Zugabe von linearem Acrylamid (LPA) als Träger (Endkonzentration: 10 - 20  $\mu\text{g/ml}$ ), 0,5 Volumenteilen Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Volumenteilen gekühltem absolutem Ethanol. Nach einer einstündigen Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die RNA bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert (mindestens 15.000 rpm). Nach zwei Mal waschen mit kaltem 80 % Ethanol wurde das RNA-Pellet in 12  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen.

### **5.10.2.2 Reverse Transkription in c-DNA**

Für die reverse Transkription wurden je Probe 5 - 8  $\mu\text{g}$  der gereinigten RNA in bis zu 11  $\mu\text{l}$  Volumen eingesetzt. Dazu wurden 1  $\mu\text{l}$  vom T7T23V-Primer pipettiert, gut gemischt, mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  auf 12  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und kurz abzentrifugiert. Nach zehnminütiger Inkubation im Heizblock bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden den Ansätze 4  $\mu\text{l}$  5 x first strand buffer, 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT und 1  $\mu\text{l}$  1 x dNTP-Mix zugegeben und weitere 2 min bei  $48\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Zugabe der

reversen Transkriptase Superscript-II (200 U/ $\mu$ l, Invitrogen) wurden die Proben zur Bildung des ersten c-DNA-Stranges für 60 min bei 42 °C inkubiert. Die c-DNA wurde in 91  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Dazu wurden 39  $\mu$ l des folgenden Master-Mix zur Bildung des zweiten Strangs pipettiert:

30 $\mu$ l	5 x second strand buffer
3 $\mu$ l	dNTP-Mix (10 mM)
1 $\mu$ l	DNA-Ligase (10 U/ $\mu$ l)
4 $\mu$ l	DNA-Polymerase-I (10 U/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	RNAse-H (2 U/ $\mu$ l)

Die c-DNA wurde für zwei Stunden bei 16 °C mit dem Master-Mix inkubiert. Nach der Zugabe von 2  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase wurde erneut 10 min bei 16 °C inkubiert und anschließend 10  $\mu$ l EDTA (0,5 M) zugegeben. Die Reagenzien für die c-DNA-Synthese für die Affymetrix-GeneChips stammten von Invitrogen.

### **5.10.2.3 c-DNA-Isolierung**

Die c-DNA-Lösung aus der reversen Transkription wurde mit 162  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gut geschüttelt und in einem PhaseLock-Röhrchen zentrifugiert (12.000 x g, 15 min). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und 0,5 Volumenteile Ammoniumacetat (7,5 M) sowie 2,5 Volumenteile absolutes gekühltes Ethanol zupipettiert. Die c-DNA wurde abzentrifugiert (12.000 x g, 15 min, RT), einmal mit 0,5 ml gekühltem 80 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit 12  $\mu$ l RNAse-freiem Wasser in Lösung gebracht.

### 5.10.2.4 Synthese der c-RNA

Die Bildung der c-RNA erfolgte mit dem Enzo-Bioarray-High-Yield-RNA-Transkript-Labeling-Kit (Affymetrix). Dazu wurde aus der c-DNA und den Reagenzien des Kits folgender Mix hergestellt:

10 µl	c-DNA
4 µl	10 x HY-Reaktions-Puffer
4 µl	10 x Biotin-markierte Ribonucleotide
4 µl	10 x DTT
4 µl	10 x RNase-Inhibitor
2 µl	T7-RNA-Polymerase
12 µl	RNase-freies Wasser

Der Mix wurde für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert und dabei in Abständen von 30 Minuten vorsichtig geschüttelt. Bei eingesetzten 5 µg total-RNA wurden Ausbeuten von 30 - 50 µg c-RNA erhalten.

### 5.10.2.5 Zweite RNA-Isolierung

Zur c-RNA-Lösung wurden 60 µl RNase-freies Wasser und 350 µl RLT-Puffer gegeben und alles gut gemischt. Nach der Zugabe von 250 µl absolutem Ethanol wurde mehrmals auf- und abpipettiert und die gesamten 700 µl auf eine RNeasy-mini-Säule gegeben und diese zentrifugiert (15 s, 10.000 rpm). Die Lösung wurde erneut auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Flüssigkeit danach verworfen. Es folgten zwei Waschstreps mit RPE-Puffer wie bei der ersten RNA-Isolierung beschrieben. Die Eluierung erfolgte mit 100 µl Reinstwasser. Auch die Präzipitation der RNA wurde bereits in Kapitel 5.10.1.1 beschrieben, abweichend wurde kein LPA und 0,1 Volumenteile Natriumacetat statt Ammoniumacetat zugegeben. Die c-RNA wurde in 10 - 20 µl RNase-

freiem Wasser ausgenommen. Mit Hilfe der Absorption bei  $\lambda = 260$  nm und 280 nm wurde der RNA-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt.

#### **5.10.2.6 Qualitätskontrolle der t-RNA und Hybridisierung auf den Chips**

Die Qualität und Integrität der aus den  $4,5$  bis  $6 \times 10^6$  Zellen isolierten t-RNA wurde mithilfe des Agilent-Technologies-2100-Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn) geprüft. Es wurde die UV-Absorption der Biotin-markierten c-RNA gemessen. Dazu wurden  $12,5 \mu\text{g}$  der c-RNA der Proben fragmentiert und in einen Hybridisierungs-Cocktail eingesetzt. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden vier biotinierte Kontrollen für die Hybridisierung eingesetzt (BioB, BioC, BioD und Cre). Die Proben wurden anschließend für 16 h zur Hybridisierung auf die HG-U133A-GeneChips gegeben. Nach dem Waschen der Chips wurden sie mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt und mit einem Affymetrix-GeneChip-Scanner ausgelesen.

#### **5.10.2.7 Auswertung der GeneChip-Daten**

Zur Auswertung der Daten wurden die Programme Microarray-Suite 5.0, MicroDB 3.0 und Data-Mining-Tool 3.0 von Affymetrix verwendet. Zur Normalisierung wurden die Experimente auf eine Target-Intensität von 150 skaliert; anderenfalls wurden die Werte aus dem Microarray-Suite-Programm verwendet. Die Ergebnisse wurden per Definition für stark und schwach regulierte Gene von Affymetrix wie folgt gefiltert: Als stark reguliert wurden Gene mit einer Expressionsänderung größer oder gleich 2 bzw. kleiner oder gleich  $-2$  eingestuft. Der statistische Parameter (Veränderung p-Wert) war kleiner als 0,01 für einen signifikanten Anstieg und größer als 0,99 für einen signifikanten Abfall der Expression; der Signalunterschied sollte größer als 100 sein. Als schwach reguliert galten Gene, die eine Expressionsänderung von größer oder gleich 1,5 bzw. kleiner oder gleich  $-1,5$  aufwiesen. Der statistische Parameter für eine signifikante Veränderung lag unter 0,001 oder über 0,9999. Die Differenz zwischen den Signalen sollte 40 überschreiten.

### 5.11 LightCycler-PCR

Als eine Neuerung für die quantitative PCR wurde 1997 erstmals der LightCycler beschrieben (Wittwer et al., 1997). Im Gegensatz zu herkömmlichen Blockcyclern handelt es sich hierbei um ein Gerät, in dem sich die Reaktionsansätze in dünnen Glaskapillaren in einem Rotor mit einem Fassungsvermögen von bis zu 32 Kapillaren befinden, die mit Hilfe von Luft als Medium mit bis zu 20 °C pro Sekunde auf die entsprechenden Temperaturen gebracht werden. Die dünnen Glaskapillaren bieten im Verhältnis zum Volumen ein günstiges Oberflächenverhältnis und Luft als Temperaturmedium ist mit seiner geringen Dichte im Vergleich zu Metall im Blockcycler sehr schnell erhitzbar und abkühlbar.

Mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs SYBR-Green I während seiner Bindung an doppelsträngige c-DNA wird eine Verstärkung von emittierter Fluoreszenz (520 nm) bei gleicher Anregungsintensität (497 nm) erzielt, die direkt proportional mit der Menge an Doppelsträngen ist.

Ein Amplifikationszyklus setzt sich aus Denaturierung, Annealing und Elongation zusammen und bewirkt eine Verdopplung der vorhandenen c-DNA des zu untersuchenden Targetgens. Bei der LightCycler-PCR (LC-PCR) wird bei der Denaturierung durch das „Schmelzen“ der DNA in Einzelstränge zunächst das SYBR-Green I freigesetzt. Das Fluoreszenzsignal ist in dieser Phase niedrig. Beim Annealing binden spezifische Oligonukleotide (Primer) an die Zielsequenzen, so dass durch Verlängerung der Primer in der Elongationsphase durch ein thermostabiles Enzym doppelsträngige DNA entsteht, mit der das SYBR-Green I interkaliert. Am Ende der Elongation wird die größte Fluoreszenzintensität detektiert. Durch eine Erhöhung der Temperatur werden die DNA-Doppelstränge denaturiert und ein neuer Zyklus beginnt. Das Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Menge der amplifizierten c-DNA und steigt wie die c-DNA-Menge selbst exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus, erhält man eine quantitative Aussage.

In einem zusätzlichen Schritt am Ende der PCR, der sogenannten „Schmelzkurve“, wird die Temperatur schrittweise so weit erhöht, dass die doppelsträngige DNA denaturiert und das SYBR-Green I freigesetzt wird. An dem Punkt, an dem die Schmelztemperatur des gebildeten Produkts erreicht ist, fällt die Fluoreszenz plötzlich ab. In der ersten negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ist dieser Fluoreszenzabfall als Peak bei

einer bestimmten für das Produkt spezifischen Temperatur sichtbar und dient daher zur Identifizierung.

### **5.11.1 Abtrypsinieren und Zählen der Zellen mit Trypanblau**

Die adhären A549-Zellen wurden einmal mit erwärmten PBS-Puffer gespült und anschließend mit einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst.

Bei submersen Ansätzen in 24er-Wells wurden 200 µl der Trypsin/EDTA-Lösung einpipettiert, die Zellen damit inkubiert (37 °C, 3 min) und der Verdau mit 1 ml A549-Medium (10 % FCS) gestoppt. Mit einer 1-ml-Pipette wurden die Zellen resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und abzentrifugiert (400 x g, 3 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 75 µl PBS-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt.

Anodisk-Membranen mit Zellen aus Expositionen an der LMG wurden aus den Spannringen genommen. Die Anodisk-Membranen wurden in 60 x 15-cm-Gewebekulturschalen mit 800 µl der Trypsin/EDTA-Lösung eingelegt und weitere 800 µl Verdauungslösung zupipettiert. Nach Inkubation (37 °C, 4 min) wurde die Enzymaktivität mit 6 ml A549-Medium (10 % FCS) gestoppt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Anodisk-Membranen abgelöst, mit der 1-ml-Pipette resuspendiert, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (400 x g, 7 min) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert.

Der Trypanblau-Test zeigt Membranschäden durch das Eindringen des Trypanblau-Farbstoff in die Zellen auf. Die daraus resultierenden dunkelblauen Zellen werden unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Ein wichtiges Kriterium für die Zellvitalität war der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl.

Zur Auszählung der Zellen wurden 25 µl der so erhaltenen Suspensionen mit 75 µl 0,2 %iger Trypanblau-Lösung gemischt (1:4-Verdünnung). Nach Wiederholung dieses Verdünnungsschritts (1:16) wurden die Zellen in den vier Eckquadraten einer Neubauer-Zählkammer an einem Axiovert-135-Durchlichtmikroskop ausgezählt. Die Neubauer-Zählkammer besitzt 9 Quadrate, die in je 16 Untereinheiten aufgeteilt sind. Die Seitenlänge eines Quadrats beträgt 1 mm. Schiebt man das Deckglas nach leichtem Anhauchen so auf, dass die Newton'schen-Ringe sichtbar werden, schließt es ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> ein.

Das Volumen über den 4 ausgezählten Quadraten beträgt 0,4  $\mu\text{l}$ . Defekte Zellen mit Membranschäden lassen das Trypanblau eindringen und sind so von intakten Zellen zu unterscheiden. Mit Formel 3 wurde die Zellzahl pro Milliliter errechnet. Die Anzahl intakter und defekter Zellen bestimmt die Viabilität der Einzelproben.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} / \text{Anzahl der Quadrate} \quad \text{Formel 3}$$

### 5.11.2 Zellaufschluss mit Tri-Reagent

Die aus der Zellzählung erhaltenen Suspensionen wurden gut resuspendiert. Je nach vorhandener Zellzahl wurden  $2 \times 10^4$  oder  $5 \times 10^4$  Zellen pro Aliquot mit 200  $\mu\text{l}$  Tri-Reagent lysiert. Tri-Reagent enthält nach Herstellerangaben Phenol und Thiocyanat. Das Lysat kann mehrere Monate bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

### 5.11.3 Extraktion und Fällung der RNA

Zur Fällung der RNA wurde dem Zelllysat 3  $\mu\text{l}$  t-RNA (5,67  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  Glycogen (Typ-IX, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Probe homogenisiert und zur Dissoziation der Nukleinsäure-Protein-Komplexe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur RNA-Extraktion wurde der Probe 40  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben und diese 15 Sekunden geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte nach Inkubation (RT, 10 min) und anschließender Zentrifugation (12.000 x g, 4  $^\circ\text{C}$ , 15 min). Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol zur wässrigen Phase präzipitierte die RNA während einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die RNA wurde bei der anschließenden Zentrifugation (12.000 x g, 4  $^\circ\text{C}$ , 12 min) als weißes, gelartiges Pellet abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 150  $\mu\text{l}$  Ethanol 75 % gewaschen und anschließend zentrifugiert (7.500 x g, 4  $^\circ\text{C}$ , 10 min). Der Überstand wurde erneut abgenommen und die RNA, um Ethanol-Reste zu entfernen, bei Raumtemperatur getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und auf Eis gestellt.



Zur Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Pellet mit einer „gelben Spitze“ resuspendiert und 5 µl der RNA-Lösung mit 995 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (pH 7,5) verdünnt (1:200). Die Extinktion bei 260 nm gibt den Gehalt an Nukleinsäuren an, während bei 280 nm Verunreinigungen durch Proteine gemessen werden.

Die RNA-Lösung kann bei –20 °C gelagert werden.

### **5.11.4 Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription wurden 4 µl der RNA-Lösung mit der niedrigsten gemessenen Konzentration und entsprechende Volumina der anderen Proben verwendet (Volumenausgleich mit DEPC-H<sub>2</sub>O), so dass in jedem Ansatz die gleiche Menge RNA enthalten war. Zur RNA wurden 17 µl des reversen Transkriptions-Mixes (siehe Reagenzien) pipettiert. Die Umschreibung von RNA zu c-DNA erfolgte im Thermocycler (Touchdown, Hybaid Ltd., Teddington, UK) für 30 min bei 42 °C. Anschließend wurde durch Erhitzen (5 min, 99 °C) die Reverse-Transkriptase inaktiviert.

### **5.11.5 LightCycler-PCR**

Die Amplifikation der c-DNA wurde mit einem RealTime-PCR-System, dem LightCycler-System (Roche, Mannheim), durchgeführt. Für einen LC-Lauf wurden 17 µl des Amplifikationsmixes in gekühlte LightCycler-Kapillaren einpipettiert und 3 µl der zu untersuchenden c-DNA hinzugegeben. Das am LightCycler eingestellte Amplifikationsprogramm ist in Tab. 25 aufgeführt.

## 5. Experimenteller Teil

---

Tab. 25. Amplifikationsprogramm am LightCycler.

Vorgang	Zyklus	Analysen- Modus	Temperatur (°C)	Zeit (sek)	Erfassungs- Modus
Denaturierung	1	-	95	600	-
Amplifikation	40	Quantifikation	95	0	-
			60	10	-
			72	25	Einfach (100 bp: 4 sek)
Schmelzen	1	Schmelzkurve	95	0	-
			60	10	-
			95	0	Kontinuierlich (0,2 °C/sek)
Kühlen	1	-	40	30	-

### 5.11.5.1 Gelelektrophorese

Bei neuen Primerpaaren wurde mittels Gelelektrophorese die Länge der codierten Nukleotidsequenz überprüft. Im LightCycler amplifizierte c-DNA-Produkte wurden auf ein 2 %iges Agarosegel mit 0,5-fachem TBE-Laufpuffer und 0,5 mg/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Als Längenstandard wurde DNA-Molecular-Weight-Marker VI (0,15-2,1 kbp) verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 150 V für 60 - 90 min. Die Produkte wurden als fluoreszierende Banden unter UV-Licht mit einem Polaroid-Film (Polapan, 9 x 12 mm) fotografiert.

### 5.11.5.2 Primerpaare

Die verwendeten Primerpaare wurden mit dem Programm „Primer3“ zusammengestellt. Es ist im Internet unter [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) zu finden. Die in Tab. 26 aufgelisteten Primersequenzen wurden im Syntheselabor der GSF hergestellt.

Tab. 26. Sequenzen der für die LC-PCR verwendeten Primer.

Allgemeine Primer, Bezeichnung	Primersequenzen
$\alpha$ -Enolase	5'-GTT AGC AAG AAAS CTG AAC GTC ACA-3' 5'-TGA AGG ACT TGT ACA GGT CAG-3'
GAPDH	5'-AGT CCA TGC CAT CAC TGC CAC-3' 3'-GTC GCT GTG GGT GAG GAG GT-5'
IL8	5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3'
IL6	5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3' 5'-CTA CAT TTG CCG AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-3'
HO1	5'-AAC TGT CGC CAC CAG AAA GCT GAG-3' 5'-AAG ATT GCC CAG AAA GCC CTG GAC-3'
HSPA6	5'-CAA GAT TCC CGA AGA GGA CA-3' 5'-ATC TCT GAA GGG CAG GAT CA-3'
Primer, Clontech- Array, Bezeichnung	Primersequenzen
FRA1	5'-CCC TGC CGC CCT GTA CCT TGT ATC-3' 5'-AGA CAT TGG CTA GGG TGG CAT CTG CA-3'
PRKAR1B	5'-TAT TCG ATG CCA TGT TCC CTG TCA CTC A-3' 5'-GAG GTC CGT CTT GGC TTT CAC GGT C-3'
CASP10	5'-AAT TTG GTC TAT GCC AGG CCC ATT TCC T-3' 5'-CAG TTG TGT CAT CTT GGC TCA CCA CAG-3'
MCP1	5'-TTC TCA AAC TGA AGC TCG CAC TCT CGC C-3' 5'-TGT GG AGT GAG TGT TCA AGT CTT CGG AGT T-3'
GCP2	5'-GTT CAG GAA CCC GCG ACC GCT CGC A-3' 5'-CTG TGG GCC TAT GGC GAA CAC TTG CAG A-3'
ITGB1	5'-CAA GGT AGA AAG TCG GGA CAA ATT ACC C-3' 5'-GGA TTG ACC ACA GTT GTT ACG GCA CTC T-3'

## 5. Experimenteller Teil

Fortsetzung 1 von Tab. 26. Primersequenzen (GeneChip, LOW-DOSE).

Primer, Affymetrix- GeneChip, LOW- DOSE, Bezeichnung	Primersequenzen
PLXNC1	5'-ATT TGC CTC CAT TGT CAT CC-3' 5'-AAA GAC AGT GCC CAA AGT GG-3'
TRPC6	5'-CTT TGA GGA GGG CAG AAC AC-3' 5'-TCC CCT TCG TTC ACT TCA TC-3'
MCJ	5'-TGT AGG ACT GGG TGT TGC AG-3' 5'-GCA TCA ATG TTT GGT GGT TG-3'
PIG11	5'-CAC ACT CAA CTG TGG GAT GG-3' 5'-TTG ACA AGA GGC TGC TGA TG-3'
TLE1	5'-ACG GAG CCA GCT GTA TTG AC-3' 5'-GCC AAG CAT TGA GGA GGT TA-3'
ZNF144	5'-TGA GTC AGT CAG CGA CAA GG-3' 5'-AAA AGG GCC CAG AAA AAG TG-3'
MUC5B	5'-TCC AAG GAG AAC CTC CCA TA-3' 5'-AGA TTG GCC GTG TAC TGA GG-3'
PLA2G2	5'-GAG CAG AAT CAC CTG TGC AA-3' 5'-AGG GTA GGG AGG GAG GGT-3'
USP7	5'-TGT GAC CTG ATG TGT CAC GA-3' 5'-AAG ACA AAC CCA CAG CGA AC-3'

Primer, Affymetrix- GeneChip, HIGH- DOSE, Bezeichnung	Primersequenzen
DC12	5'-GGC TAG GGC TAG AGC AGA CC-3' 5'-GTT GGG AAG GGA GAC ACA AA-3'
BIRC5	5'-TTT GCC ACT GCT GTG TGA TT-3' 5'-CAC CCT GCA GCT CTA TGA CA-3'
KIAA0186	5'-ACA ACA AAA ACC CCT GTT GG-3' 5'-CAG TTT AGC AAG GCT GAA GGA-3'
RPS11	5'-GGG GGA CAG GTG TAC AGA CA-3' 5'-AGC CGA CCA TCT TTC AAA AC-3'
ABHD2	5'-GGG CAG AAA GAT CAC ACA CA-3' 5'-AGC AGC TTT CAG TTG CAC TTC-3'
KIAA0870	5'-AGC TCC AGC TTC TCA GGA CA-3' 5'-AGC AAA ATC CAA CCT CTC CA-3'
FLJ10665	5'-CAG AGA GAT CCG GGA GGA G-3' 5'-TCT TGA TCC CCA AAC AGA GC-3'
PTPRN	5'-TCT TTG CCT GTG TGA GCA TC-3' 5'-CTC CAC CCC ATT CTT CCA TA-3'

### 5.11.5.3 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte mit den erhaltenen Schmelzkurven und den Fluoreszenzkurven. Die spezifische Schmelztemperatur eines Produktes wurde dabei zur Identifizierung verwendet. Zusätzlich wurde beim ersten LC-Lauf mit einem neuen Primerpaar das c-DNA-Produkt aus der LightCycler-Kapillare auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 5.11.5.1). Die Lage der Banden gab Aufschluss über die Größe des amplifizierten Produkts. Mit den Fluoreszenzkurven wurde die c-DNA-Menge in den einzelnen Proben verglichen. Bestimmt wurde die Anzahl der benötigten Amplifikationszyklen zum Erreichen einer bestimmten, im linearen Bereich der Proben liegenden Fluoreszenz. Hat eine Probe diesen Wert einen Zyklus später erreicht als eine zweite Probe, so lag bei der ersten Probe anfangs die Hälfte an c-DNA vor.

Mit Hilfe eines Housekeeping-Genes, der  $\alpha$ -Enolase, wurden die Proben korrigiert. Die  $\alpha$ -Enolase wurde in allen Proben amplifiziert und zeigte kleine Unterschiede in den eingesetzten c-DNA-Mengen der einzelnen Proben. Aus der Auswertung dieser Amplifikation wurden Korrekturfaktoren berechnet.

## 5.12 Statistik

Messergebnisse aus den PCR-Daten mehrerer Expositionen wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD, + 1 s) angegeben. Wenn nichts Anderes angegeben ist, wurde mit dem parametrischen One-Sample-t-Test auf Signifikanz geprüft (signifikant,  $p \leq 0,05$ ; hoch signifikant,  $p \leq 0,01$ ). Mit dem nichtparametrischen One-Sample-Wilcoxon-Signed-Rank-Test (SR-Test) wurde die Häufigkeit des Differenzvorzeichens (+/-) bei nicht normalverteilten Daten gewertet; dieser Test wurde bei den Genexpressionsänderungen von HSPA6 und HO1 nach MID-DOSE-Exposition (signifikant,  $p \leq 0,05$ ; hoch signifikant,  $p \leq 0,01$ ) und den Affymetrix-GeneChip-Daten verwendet. Bei letzteren wurde ein p-Wert für die Veränderung zwischen den einzelnen Chips mittels SR-Test berechnet. Bei einem p-Wert nahe 0,5 waren die Signale der Chips gleichartig, bei einem p-Wert nahe 0 lag ein erhöhtes und nahe 1 ein vermindertes Expressionsniveau vor. Der SR-Test ist gegenüber Extremwerten unempfindlicher als der t-Test.

## 6 Abkürzungen

%	Prozent
#	Partikelanzahl
CAPs	Konzentrierte Umweltpartikel (concentrated ambient particles)
c-DNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CMD	Medianer Durchmesser der Partikelgrößenverteilung
CPC	Kondensationskernzähler
DEP	Dieselrußpartikel (diesel exhaust particles)
DMA	Differentieller Mobilitätsanalysator
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dpi	Bildpunkte pro Längeneinheit
EC	Elementarer Kohlenstoff
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	D-Glyceraldehyd-Phosphatdehydrogenase
g-DNA	Genomische DNA
GFG1000	Funkengenerator
h	Stunde
HO1	Hämoxygenase 1
HSP	HeatShock-Protein
HSPA6	HeatShock-Protein 70 B`
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
kbp	Kilo-Basenpaare
KV	Kammerversuch
L	Liter
$\lambda$	Wellenlänge
LC	LightCycler

---

LMG	Luft-Medium-Grenzschicht
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol pro Liter
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
MMD	Medianer Massendurchmesser
m-RNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
$N_A$	Konzentration (nach der Anzahl)
$N_M$	Konzentration (nach der Masse)
$\Omega$	Ohm
O.D.	Optische Dichte
p	Signifikanzwahrscheinlichkeit
PAH	Polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM2.5	Partikuläres Material unter 2,5 $\mu$ m
PM10	Partikuläres Material unter 10 $\mu$ m
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	Relative Feuchte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (ca. 25°C)
$\sigma_g$	Geometrische Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SkT	Skalenteile
SMPS	Scanning-Mobility-Particle-Sizer
SR-Test	Wilcoxon-Signed-Rank-Test
TEER	Spezifischer transepithelialer elektrischer Widerstand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
uf	Ultrafein
ZNF	Zinkfinger

## 7 Literaturverzeichnis

- Abu-Dahab, R., Schafer, U. F., and Lehr, C. M. (2001). Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. *Eur J Pharm Sci* **14**, 37-46.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., and Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* **274**, 26071-8.
- Anttila, S., Hakkola, J., Tuominen, P., Elovaara, E., Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., Hirvonen, A., and Nurminen, T. (2003). Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res* **63**, 8623-8.
- Aufderheide, M., Horlebein, A., and Tauscher, M. (1999). Comparison of cytoskeletal structures in glass-adherent and polyethylene terephthalate (PET) membrane-adherent human pulmonary fibroblasts. *Exp Toxicol Pathol* **51**, 3-7.
- Aufderheide, M., Ritter, D., Knebel, J. W., and Scherer, G. (2001). A method for in vitro analysis of the biological activity of complex mixtures such as sidestream cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* **53**, 141-52.
- Banks, M. A., Porter, D. W., Martin, W. G., and Castranova, V. (1990). Effects of in vitro ozone exposure on peroxidative damage, membrane leakage, and taurine content of rat alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **105**, 55-65.
- Baulig, A., Sourdeval, M., Meyer, M., Marano, F., and Baeza-Squiban, A. (2003). Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro* **17**, 567-73.
- Becker, S., Soukup, J. M., Sioutas, C., and Cassee, F. R. (2003). Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res* **29**, 29-44.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Schulz, H., Schumann, G., Ziesenis, A., and Heyder, J. (2003). Formation of prostaglandin E2, leukotriene B4 and 8-isoprostane in alveolar macrophages by ultrafine particles of elemental carbon. *Adv Exp Med Biol* **525**, 117-20.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K. L., Schumann, G., Schulz, H., Takenaka, S., Ziesenis, A., Stettmaier, K., Bors, W., and Heyder, J. (2002). Biochemische Mechanismen der Wirkung ultrafeiner Kohlenstoffpartikel: Einfluss von Oberfläche und oxidativem Potential. In "Wirkung und Erfassung von Fein- und Ultrafeinstäuben", pp. 87-109. Mücke, W., München.



- Berube, K. A., Jones, T. P., Williamson, B. J., Winters, C., Morgan, A. J., and Richards, R. J. (1999). Physicochemical characterization of diesel exhaust particles: factors for assessing biological activity. *Atmos Environ* **33**, 1599-1614.
- Bolton, D. C., Tarkington, B. K., Zee, Y. C., and Osebold, J. W. (1982). An in vitro system for studying the effects of ozone on mammalian cell cultures and viruses. *Environ Res* **27**, 466-75.
- Bommel, H., Haake, M., Luft, P., Horejs-Hoeck, J., Hein, H., Bartels, J., Schauer, C., Pöschl, U., Kracht, M., and Duschl, A. (2003). The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL8 but not of eotaxin. *Int Immunopharmacol* **3**, 1371-9.
- Bougeret, C., Mansur, I. G., Dastot, H., Schmid, M., Mahouy, G., Bensussan, A., and Boumsell, L. (1992). Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *J Immunol* **148**, 318-23.
- Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paoletti, L., Arancia, G., and Fiorentini, C. (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ Res* **95**, 82-91.
- Chen, J., Chen, Z., Narasaraju, T., Jin, N., and Liu, L. (2004). Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Lab Invest* **84**, 727-35.
- Chen, X. L., Varner, S. E., Rao, A. S., Grey, J. Y., Thomas, S., Cook, C. K., Wasserman, M. A., Medford, R. M., Jaiswal, A. K., and Kunsch, C. (2003). Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem* **278**, 703-11.
- Cheng, M. D., Malone, B., and Storey, J. M. (2003a). Monitoring cellular responses of engine-emitted particles by using a direct air-cell interface deposition technique. *Chemosphere* **53**, 237-43.
- Cheng, T. J., Kao, H. P., Chan, C. C., and Chang, W. P. (2003b). Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells. *Environ Res* **93**, 279-84.
- Chin, B. Y., Trush, M. A., Choi, A. M., and Risby, T. H. (2003). Transcriptional regulation of the HO1 gene in cultured macrophages exposed to model airborne particulate matter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L473-80.
- Choi, A. M., and Alam, J. (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 9-19.
- Chou, Y. C., Lin, S. B., Tsai, L. H., Tsai, H. I., and Lin, C. M. (2003). Cholesterol deficiency increases the vulnerability of hippocampal glia in primary culture to glutamate-induced excitotoxicity. *Neurochem Int* **43**, 197-209.

- Chow, J. C., Watson, J. G., Crow, D., Lowenthal, D. H., and Merrifield, T. (2001). Comparison of IMPROVE and NIOSH Carbon Measurement. *Aerosol Sci Technol* **34**, 23-34.
- Cook, J. A., and Mitchell, J. B. (1989). Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* **179**, 1-7.
- Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., and Weibel, E. R. (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* **126**, 332-7.
- Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., and Segal-Eiras, A. (1999). Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). *Pathol Oncol Res* **5**, 197-204.
- de Hartog, J. J., Hoek, G., Peters, A., Timonen, K. L., Ibaldo-Mulli, A., Brunekreef, B., Heinrich, J., Tiittanen, P., van Wijnen, J. H., Kreyling, W., Kulmala, M., and Pekkanen, J. (2003). Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* **157**, 613-23.
- Diamond, G., Legarda, D., and Ryan, L. K. (2000). The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* **173**, 27-38.
- Dick, C. A. J., Stone, V., Brown, D. M., Watt, M., Cherrie, J. W., Howarth, S., Seaton, A., and Donaldson, K. (2000). Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmos Environ* **34**, 2587-2592.
- Dobbs, L. G., Gonzalez, R., Matthay, M. A., Carter, E. P., Allen, L., and Verkman, A. S. (1998). Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2991-6.
- Don Porto Carero, A., Hoet, P. H., Verschaeve, L., Schoeters, G., and Nemery, B. (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* **37**, 155-63.
- Fakler, C. R., Wu, B., McMicken, H. W., Geske, R. S., and Welty, S. E. (2000). Molecular mechanisms of lipopolysaccharide induced ICAM-1 expression in A549 cells. *Inflamm Res* **49**, 63-72.
- Flowers-Geary, L., Bleczinski, W., Harvey, R. G., and Penning, T. M. (1996). Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Biol Interact* **99**, 55-72.

- Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P. C., Sessa, W. C., and Altieri, D. C. (2003). Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13791-6.
- Foster, K. A., Yazdanian, M., and Audus, K. L. (2001). Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J Pharm Pharmacol* **53**, 57-66.
- Fuchs, S., Hollins, A. J., Laue, M., Schaefer, U. F., Roemer, K., Gumbleton, M., and Lehr, C. M. (2003). Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res* **311**, 31-45.
- Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J. C., Vincent, R., and Van Eeden, S. F. (2001). Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 265-71.
- Fukano, Y., Ogura, M., Eguchi, K., Shibagaki, M., and Suzuki, M. (2004). Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* **55**, 317-23.
- Garcon, G., Gosset, P., Garry, S., Marez, T., Hannotiaux, M. H., and Shirali, P. (2001a). Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Toxicol Lett* **121**, 107-17.
- Garcon, G., Zerimech, F., Hannotiaux, M., Gosset, P., Martin, A., Marez, T., and Shirali, P. (2001b). Antioxidant defense disruption by polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles in human lung cells (A549). *Toxicology* **166**, 129-37.
- Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Gilmour, P. S., Ziesenis, A., Morrison, E. R., Vickers, M. A., Drost, E. M., Ford, I., Karg, E., Mossa, C., Schroepel, A., Ferron, G. A., Heyder, J., Greaves, M., MacNee, W., and Donaldson, K. (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Griese, M., and Reinhardt, D. (1998). Smaller sized particles are preferentially taken up by alveolar type II pneumocytes. *J Drug Target* **5**, 471-9.
- Hall, K. T., Boumsell, L., Schultze, J. L., Boussiotis, V. A., Dorfman, D. M., Cardoso, A. A., Bensussan, A., Nadler, L. M., and Freeman, G. J. (1996). Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11780-5.
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin 8 (IL8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* **56**, 559-64.

- He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M., and Alam, J. (2001). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* **276**, 20858-65.
- Hebisch, R., Dabill, D., Dahmann, D., Diebold, F., Geiregat, N., Grosjean, R., Mattenklott, M., Perret, V., and Guillemin, M. (2003). Sampling and analysis of carbon in diesel exhaust particulates-an international comparison. *Int Arch Occup Environ Health* **76**, 137-42.
- Helsper, C., Mölter, W., Löffler, F., Wadenpohl, C., Kaufmann, S., and Wenninger, G. (1993). Investigations of a new aerosol generator for the production of carbon aggregate particles. *Atmos Environ* **27A**, 1271-1275.
- Hetland, R. B., Cassee, F. R., Refsnes, M., Schwarze, P. E., Lag, M., Boere, A. J., and Dybing, E. (2004). Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicol In Vitro* **18**, 203-12.
- Heyder, J., Gebhart, J., Roth, C., and Ferron, G. A. (2003). Transport and deposition of hydrophilic drug particles in the lungs- experiment and theory. In "Optimization of aerosol drug delivery" (L. Gradon and J. Marijnissen, eds.), pp. 139-147. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C. F., and Stahlhofen, W. (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.0005-15 µm. *J Aerosol Sci* **17**, 811-825.
- Heyder, J., and Svartengren, M. U. (2001). Basic Principles of Particle Behaviour in the Human Respiratory Tract. In "Drug Delivery To The Lung" (H. Bisgaard, C. O'Callaghan and G. C. Smaldone, eds.), pp. 21-45, New York, Basel.
- Hirano, S., Furuyama, A., Koike, E., and Kobayashi, T. (2003). Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology* **187**, 161-70.
- Hofer, T. P., Bitterle, E., Beck-Speier, I., Maier, K. L., Frankenberger, M., Heyder, J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2004). Diesel exhaust particles increase LPS-stimulated COX-2 expression and PGE2 production in human monocytes. *J Leukoc Biol* **75**, 856-64.
- Hohfeld, J., Minami, Y., and Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-98.
- Horvath, I., Donnelly, L. E., Kiss, A., Paredi, P., Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. (1998). Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax* **53**, 668-72.

- Huang, S. L., Hsu, M. K., and Chan, C. C. (2003). Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect* **111**, 478-82.
- Ibald-Mulli, A., Stieber, J., Wichmann, H. E., Koenig, W., and Peters, A. (2001). Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach. *Am J Public Health* **91**, 571-7.
- Karle, C., Gehrig, T., Wodopia, R., Hoschele, S., Kreye, V. A., Katus, H. A., Bartsch, P., and Mairbaurl, H. (2004). Hypoxia-induced inhibition of whole cell membrane currents and ion transport of A549 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Keyse, S. M., and Tyrrell, R. M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 99-103.
- Knebel, J. W., Ritter, D., and Aufderheide, M. (1998). Development of an in vitro system for studying effects of native and photochemically transformed gaseous compounds using an air/liquid culture technique. *Toxicol Lett* **96-97**, 1-11.
- Kobayashi, S., Kondo, S., and Juni, K. (1995). Permeability of peptides and proteins in human cultured alveolar A549 cell monolayer. *Pharm Res* **12**, 1115-9.
- Kong, X., San Juan, H., Behera, A., Peoples, M. E., Wu, J., Lockey, R. F., and Mohapatra, S. S. (2004). ERK-1/2 activity is required for efficient RSV infection. *FEBS Lett* **559**, 33-8.
- Konings, A. W. (1986). Mechanisms of ozone toxicity in cultured cells. I. Reduced clonogenic ability of polyunsaturated fatty acid-supplemented fibroblasts. Effect of vitamin E. *J Toxicol Environ Health* **18**, 491-7.
- Kumagai, Y., Koide, S., Taguchi, K., Endo, A., Nakai, Y., Yoshikawa, T., and Shimojo, N. (2002). Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. *Chem Res Toxicol* **15**, 483-9.
- Laden, F., Neas, L. M., Dockery, D. W., and Schwartz, J. (2000). Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ Health Perspect* **108**, 941-7.
- Leonard, E. J., Skeel, A., and Yoshimura, T. (1991). Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1). *Adv Exp Med Biol* **305**, 57-64.
- Leung, T. K., Hall, C., Rajendran, M., Spurr, N. K., and Lim, L. (1992). The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics* **12**, 74-9.
- Leung, T. K., Rajendran, M. Y., Monfries, C., Hall, C., and Lim, L. (1990). The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J* **267**, 125-32.

- Li, J., Gao, E., and Mendelson, C. R. (1998). Cyclic AMP-responsive expression of the surfactant protein-A gene is mediated by increased DNA binding and transcriptional activity of thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* **273**, 4592-600.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J., and Gu, W. (2002a). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* **416**, 648-53.
- Li, N., Kim, S., Wang, M., Froines, J., Sioutas, C., and Nel, A. (2002b). Use of a stratified oxidative stress model to study the biological effects of ambient concentrated and diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol* **14**, 459-86.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455-60.
- Li, N., Venkatesan, M. I., Miguel, A., Kaplan, R., Gujuluva, C., Alam, J., and Nel, A. (2000). Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* **165**, 3393-401.
- Li, N., Wang, M., Oberley, T., Sempf, J., and Nel, A. (2002c). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* **169**, 4531-4541.
- Liang, X. Q., Cao, E. H., Zhang, Y., and Qin, J. F. (2003). P53-induced gene 11 (PIG11) involved in arsenic trioxide-induced apoptosis in human gastric cancer MGC-803 cells. *Oncol Rep* **10**, 1265-9.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* **17**, 62-70.
- Liu, Y., Dehni, G., Purcell, K. J., Sokolow, J., Carcangiu, M. L., Artavanis-Tsakonas, S., and Stifani, S. (1996). Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia. *Genomics* **31**, 58-64.
- Maier, K. L., Beck-Speier, I., Dayal, N., Dirscherl, P., Griese, M., Heilmann, P., Hinze, H., Josten, M., Karg, E., Kreyling, W. G., Lenz, A., Leuschel, L., Meyer, B., Miaskowski, U., Reitmeir, P., Ruprecht, L., Schumann, G., Ziesenis, A., and Heyder, J. (1999). Health effects of sulfur-related environmental air pollution. II. Cellular and molecular parameters of injury. *Inhal Toxicol* **11**, 361-89.
- Minuth, W. W., Kloth, S., Aigner, J., Sittinger, M., and Rockl, W. (1996). Approach to an organo-typical environment for cultured cells and tissues. *Biotechniques* **20**, 498-501.

- Minuth, W. W., and Rudolph, U. (1990). A compatible support system for cell culture in biomedical research. *Cytotechnology* **4**, 181-9.
- Minuth, W. W., Schumacher, K., Strehl, R., and Kloth, S. (2000). Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* **11**, 495-522.
- Minuth, W. W., Stockl, G., Kloth, S., and Dermietzel, R. (1992). Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions. *Eur J Cell Biol* **57**, 132-7.
- Mogel, M., Kruger, E., Krug, H. F., and Seidel, A. (1998). A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue. *Toxicol Lett* **96-97**, 25-32.
- Nilius, B., Droogmans, G., and Wondergem, R. (2003). Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle? *Endothelium* **10**, 5-15.
- Nishimura, R. N., Santos, D., Esmaili, L., Fu, S. T., and Dwyer, B. E. (2000). Expression of antisense hsp70 is a major determining factor in heat-induced cell death of P-19 carcinoma cells. *Cell Stress Chaperones* **5**, 173-80.
- Osornio-Vargas, A. R., Hernandez-Rodriguez, N. A., Yanez-Buruel, A. G., Ussler, W., Overby, L. H., and Brody, A. R. (1991). Lung cell toxicity experimentally induced by a mixed dust from Mexicali, Baja California, Mexico. *Environ Res* **56**, 31-47.
- Pace, D. M., Thompson, J. R., Aftonomos, B. T., and Holck, H. G. (1961). The effects of NO<sub>2</sub> and salts of NO<sub>2</sub> upon established cell lines. *Can J Med Sci* **39**, 1247-55.
- Pan, Y., and Loo, G. (2000). Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radic Biol Med* **28**, 824-30.
- Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E., and Mittleman, M. A. (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2810-5.
- Peters, A., Wichmann, H. E., Tuch, T., Heinrich, J., and Heyder, J. (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1376-83.
- Pinot, F., el Yaagoubi, A., Christie, P., Dinh-Xuan, A. T., and Polla, B. S. (1997). Induction of stress proteins by tobacco smoke in human monocytes: modulation by antioxidants. *Cell Stress Chaperones* **2**, 156-61.
- Pope, C. A., 3rd, Verrier, R. L., Lovett, E. G., Larson, A. C., Raizenne, M. E., Kanner, R. E., Schwartz, J., Villegas, G. M., Gold, D. R., and Dockery, D. W. (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* **138**, 890-9.

- Poss, K. D., and Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10925-30.
- Prester, T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, Y. I., Lee, P. J., and Choi, A. M. (1995). Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Mol Med* **1**, 827-37.
- Proost, P., Wuyts, A., and Van Damme, J. (1996). Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP1. *J Leukoc Biol* **59**, 67-74.
- Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L. C., Kumar, A., Su, W. C., Choy, W., Talbot, A., and Gordon, T. (2002). Size fractions of ambient particulate matter induce granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells by mitogen-activated protein kinase pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 455-62.
- Renwick, L. C., Brown, D., Clouter, A., and Donaldson, K. (2004). Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occup Environ Med* **61**, 442-7.
- Risom, L., Dybdahl, M., Bornholdt, J., Vogel, U., Wallin, H., Moller, P., and Loft, S. (2003). Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis* **24**, 1847-52.
- Ritter, D., Knebel, J. W., and Aufderheide, M. (2001). In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds--development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp Toxicol Pathol* **53**, 373-86.
- Roth, C., Ferron, G. A., Karg, E., Lentner, B., Schumann, G., Takenaka, S., and Heyder, J. (2004). Generation of Ultrafine Particles by Spark Discharging. *Aerosol Sci Technol* **38**, 228-235.
- Rothman, J. E. (1989). Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**, 591-601.
- Ryder, M. I., Hyun, W., Loomer, P., and Haqq, C. (2004). Alteration of gene expression profiles of peripheral mononuclear blood cells by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* **19**, 39-49.
- Sato, H., Sagai, M., Suzuki, K. T., and Aoki, Y. (1999). Identification, by cDNA microarray, of A-raf and proliferating cell nuclear antigen as genes induced in rat lung by exposure to diesel exhaust. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **105**, 77-86.
- Schauer, C., Niessner, R., and Pöschl, U. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. *Environ Sci Technol* **37**, 2861-8.



- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70.
- Schwartz, J., Dockery, D. W., and Neas, L. M. (1996). Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* **46**, 927-39.
- Schwartz, J., Dockery, D. W., Neas, L. M., Wypij, D., Ware, J. H., Spengler, J. D., Koutrakis, P., Speizer, F. E., and Ferris, B. G., Jr. (1994). Acute effects of summer air pollution on respiratory symptom reporting in children. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 1234-42.
- Smith, K. R., Veranth, J. M., Hu, A. A., Lighty, J. S., and Aust, A. E. (2000). Interleukin 8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal. *Chem Res Toxicol* **13**, 118-25.
- Stearns, R., Paulauskis, J., and Godleski, J. (2001). Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 108-115.
- Stober, J., Schleicher, B., and Burtscher, H. (1991). Bipolar Diffusion Charging of Particles in Noble Gases. *Aerosol Sci Technol* **14**, 66-73.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., and Ames, B. N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043-6.
- Stone, K. C., Mercer, R. R., Gehr, P., Stockstill, B., and Crapo, J. D. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 235-43.
- Stone, V., Brown, D. M., Watt, N., Wilson, M., Donaldson, K., Ritchie, H., and MacNee, W. (2000). Ultrafine particle-mediated activation of macrophages: intracellular calcium signalling and oxidative stress. *Inhalation Toxicology* **12**, 345-351.
- Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Burdick, M. D., Lincoln, P. M., and Walz, A. (1992). The detection of a novel neutrophil-activating peptide (ENA-78) using a sensitive ELISA. *Immunol Invest* **21**, 589-96.
- Stringer, B., Imrich, A., and Kobzik, L. (1996). Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL8 production. *Experimental Lung Research* **22**, 495-508.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., and Comoglio, P. M. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* **99**, 71-80.

- Tan, A. S., and Berridge, M. V. (2000). Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *J Immunol Methods* **238**, 59-68.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R. L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**, 23-8.
- Tippe, A., Heinzmann, U., and Roth, C. (2002). Deposition of fine and ultrafine aerosol particles during exposure at the air/cell interface. *Aerosol Sci* **33**, 207-218.
- Toimela, T. A., and Tahti, H. (2001). Effects of mercuric chloride exposure on the glutamate uptake by cultured retinal pigment epithelial cells. *Toxicol In Vitro* **15**, 7-12.
- Tuch, T., Brand, P., Wichmann, H. E., and Heyder, J. (1997). Variation of particle number and mass concentration in various size ranges of ambient aerosols in eastern germany. *Atmos Environ* **31**, 4193-4197.
- Ukeda, H., Shimamura, T., Tsubouchi, M., Harada, Y., Nakai, Y., and Sawamura, M. (2002). Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in Maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt. *Anal Sci* **18**, 1151-4.
- Vayssier-Taussat, M., Camilli, T., Aron, Y., Meplan, C., Hainaut, P., Polla, B. S., and Weksler, B. (2001). Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1293-300.
- Verheyen, G. R., Nuijten, J. M., Van Hummelen, P., and Schoeters, G. R. (2004). Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on in vitro cultured macrophages. *Toxicol In Vitro* **18**, 377-91.
- Vincenz, C., and Dixit, V. M. (1997). Fas-associated death domain protein interleukin 1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem* **272**, 6578-83.
- Voelkel, K., Krug, H. F., and Diabate, S. (2003). Formation of reactive oxygen species in rat epithelial cells upon stimulation with fly ash. *J Biosci* **28**, 51-5.
- von Klot, S., Wolke, G., Tuch, T., Heinrich, J., Dockery, D. W., Schwartz, J., Kreyling, W. G., Wichmann, H. E., and Peters, A. (2002). Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* **20**, 691-702.
- Warheit, D. B., Chang, L. Y., Hill, L. H., Hook, G. E., Crapo, J. D., and Brody, A. R. (1984). Pulmonary macrophage accumulation and asbestos-induced lesions at sites of fiber deposition. *Am Rev Respir Dis* **129**, 301-10.
- Weller, N. K., and Karnovsky, M. J. (1986). Isolation of pulmonary alveolar type I cells from adult rats. *Am J Pathol* **124**, 448-56.

- Wichmann, H. E., Spix, C., Tuch, T., Wolke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W. G., and Heyder, J. (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-86; discussion 87-94.
- Wirtz, H. R., and Schmidt, M. (1996). Acute influence of cigarette smoke on secretion of pulmonary surfactant in rat alveolar type II cells in culture. *Eur Respir J* **9**, 24-32.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., and Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-81.
- Zhang, Q., Kleeberger, S. R., and Reddy, S. P. (2004). DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L427-36.
- Zhu, Y., Hinds, W. C., Kim, S., and Sioutas, C. (2002). Concentration and size distribution of ultrafine particles near a major highway. *J Air Waste Manag Assoc* **52**, 1032-42.

## 8 Anhang zu den Ergebnissen

### 8.1 Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array

Tab. 27. Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array; durch Exposition mit uf-EC-Partikeln, durch die Kombination (EC + TNF) und durch TNF-Stimulation; die letzte Spalte benennt den vorliegenden Effekt; Pfeile zeigen Expressionsänderungen über 30 % an; alle Änderungen beziehen sich auf die Kammerkontrolle. Verwendet wurde der Röntgenfilm, auf dem die Veränderungen am Besten zu sehen sind.

Gen-Symbol	Genexpressions- änderung durch EC	Genexpressions- änderung durch (EC + TNF)	Genexpressions- änderung durch TNF	Effekt
AQP3	10 % verringert ↓	75 % verringert ↓	51 % verringert ↓	(EC + TNF) synergistisch
bcl-3	↑ 71 % erhöht	↑ 208 % erhöht	↑ 599 % erhöht	TNF-Effekt durch EC vermindert
CASP10	↑ 123 % erhöht	↑ 302 % erhöht	20 % verringert	EC-Effekt
c-myc	↓ 34 % verringert ↓	59 % verringert ↓	81 % verringert ↓	TNF-Effekt durch EC vermindert
CRF1	↑ 64 % erhöht	↑ 1352 % erhöht	↑ 843 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
CSF-1	↓ 47 % verringert ↓	72 % verringert ↓	70 % verringert ↓	EC-Effekt
DAD1	22 % verringert	20 % verringert	↓ 56 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
E16	6 % erhöht	unverändert	↑ 105 % erhöht	TNF-Effekt durch EC unterdrückt
ems-1	9 % verringert	27 % erhöht	↓ 48 % verringert	TNF-Effekt durch EC umgedreht
ERCC1	3 % verringert ↓	69 % verringert ↓	42 % verringert ↓	(EC + TNF) synergistisch
FAST	↑ 34 % erhöht	↓ 68 % verringert ↓	81 % verringert ↓	TNF-Effekt durch EC vermindert
FRA1	↑ 220 % erhöht	↑ 159 % erhöht	↑ 419 % erhöht	EC-Effekt
GCP2	27 % verringert	↑ 243 % erhöht	↑ 46 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
GIRK2	↓ 76 % verringert ↓	100 % verringert ↓	55 % verringert ↓	EC-Effekt, (EC + TNF) synergistisch

Fortsetzung 1 von Tab. 27. Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array.

Gen-Symbol	Genexpressions- änderung durch EC	Genexpressions- änderung durch (EC + TNF)	Genexpressions- änderung durch TNF	Effekt
GLUT1	5 % verringert	7 % verringert	↓ 55 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
GNAS	24 % verringert	17 % verringert	↓ 54 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
GNB1	↑ 94 % erhöht	↑ 622 % erhöht	↑ 486 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
HPI31	↑ 105 % erhöht	12 % verringert	↑ 129 % erhöht	EC-Effekt
ID-1	17 % erhöht	↓ 87 % verringert	↓ 78 % verringert	TNF-Effekt
IEX-1L	↑ 305 % erhöht	↑ 124 % erhöht	8 % verringert	EC-Effekt
IL8	↓ 40 % verringert	↑ 1198 % erhöht	↑ 448 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
IRF1	↓ 34 % verringert	↑ 535 % erhöht	↑ 333 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
ITGB1	↑ 718 % erhöht	↑ 413 % erhöht	↑ 85 % erhöht	EC-Effekt
ITGB4	↑ 200 % erhöht	↑ 66 % erhöht	↑ 145 % erhöht	EC-Effekt
MAPKAPK -2	↓ 45 % verringert	↓ 49 % verringert	↓ 72 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
MCP1	↓ 43 % verringert	↑ 635 % erhöht	↑ 180 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
MIP2-α	↓ 50 % verringert	↑ 2072 % erhöht	↑ 1269 % erhöht	(EC + TNF) synergistisch
NDKA	↓ 31 % verringert	↓ 65 % verringert	↓ 33 % verringert	(EC + TNF) synergistisch
NLK	17 % verringert	29 % verringert	↓ 60 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
N-sam	19 % erhöht	↓ 71 % verringert	↑ 272 % erhöht	TNF-Effekt durch EC unterdrückt
NTRK3	↑ 31 % erhöht	↑ 1133 % erhöht	↓ 100 % verringert	Effekt nur durch (EC + TNF)
PI3-kinase	↓ 31 % verringert	↑ 1434 % erhöht	↓ 91 % verringert	Effekt nur durch (EC + TNF)
PKCII	29 % verringert	↓ 42 % verringert	↓ 62 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
PKCSH	11 % verringert	26 % verringert	↓ 60 % verringert	TNF-Effekt durch EC vermindert
PLGF	↓ 34 % verringert	↑ 628 % erhöht	↑ 611 % erhöht	TNF-Effekt
PP-1A	3 % erhöht	↓ 68 % verringert	↓ 49 % verringert	(EC + TNF) synergistisch

## 8. Anhang zu den Ergebnissen

Fortsetzung 2 von Tab. 27. Genexpressionsänderungen beim Clontech-Array.

Gen-Symbol	Genexpressions- änderung durch EC	Genexpressions- änderung durch (EC + TNF)	Genexpressions- änderung durch TNF	Effekt
PRKAR1B	↑ 3203 % erhöht	↑ 492 % erhöht	↑ 1106 % erhöht	EC-Effekt
RAP1GAP	↓ 42 % verringert	5 % erhöht	↓ 48 % verringert	EC-Effekt, durch (EC + TNF) unterdrückt
rhoB	↑ 514 % erhöht	↑ 283 % erhöht	↑ 279 % erhöht	EC-Effekt
TAXREB302	↑ 99 % erhöht	↓ 83 % verringert	↑ 42 % erhöht	EC-Effekt
TDPX2	↓ 57 % verringert	↓ 55 % verringert	↓ 81 % verringert	EC-Effekt
TIMP1	↑ 102 % erhöht	↓ 56 % verringert	8 % erhöht	EC-Effekt
TNF	↓ 36 % verringert	↑ 325 % erhöht	23 % verringert	Effekt nur durch (EC + TNF)
TTP	↑ 40 % erhöht	↑ 141 % erhöht	↑ 199 % erhöht	TNF-Effekt durch EC vermindert

Tab. 28. Abkürzungen der Gene, die beim Clontech-Array veränderte Expressionen aufweisen.

Gen-Symbol	Name des Gens
AQP3	Water channel aquaporin 3
bcl-3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
CASP10	Caspase-10 precursor; ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4; fas-associated death domain protein; interleukin 1-beta-converting enzyme 2 (FLICE2)
c-myc	c-myc oncogene
CRF1	Corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1)
CSF-1	Macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF)
DAD1	Defender against cell death 1
E16	E16 amino acid transporter
ems-1	Cortactin; amplaxin; ems-1 oncogene
ERCC1	DNA excision repair protein
FAST	Fas-activated serine/threonine kinase
FRA1	Fos-related antigen
GCP2	Granulocyte chemotactic protein 2; neutrophil-activating peptide ENA-78
GIRK2	G protein-activated inward rectifier potassium channel 2; KATP-2; BIR1; KIR32
GLUT1	Erythrocyte glucose transporter 1

Fortsetzung 1 von Tab. 28. Abkürzungen der Gene, die beim Clontech-Array veränderte Expressionen aufweisen.

Gen-Symbol	Name des Gens
GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G-s alpha subunit; adenylate cyclase-stimulating G alpha protein
GNB1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit; transducin beta-1 subunit
HPI31	Proteasome inhibitor HPI31 subunit
ID-1	DNA-binding protein inhibitor; Id-1H
IEX-1L	Anti-death protein; PRG-1; DIF-2
IL8	Interleukin 8 precursor; monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein 1 (NAP1); lymphocyte-derived neutrophil-activating factor (LYNAP); protein 3-10C
IRF1	Interferon regulatory factor 1
ITGB1	Fibronectin receptor beta subunit (FNRB); integrin beta 1; VLA4 beta subunit; CD29 antigen
ITGB4	Integrin beta 4; CD104 antigen
MAPKAPK-2	MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAP kinase 2)
MCP1	Monocyte chemotactic protein 1 precursor; monocyte chemotactic and activating factor (MCAF); monocyte secretory protein JE; monocyte chemoattractant protein 1; HC11; small inducible cytokine A2 (SCYA2)
MIP2- $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 2 alpha; growth-regulated protein beta (GRO-beta)
NDKA	Nucleoside diphosphate kinase A; NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23 (NM23-H1)
NLK	Neuroleukin; glucose-6-phosphate isomerase (GPI); phosphoglucose isomerase (PGI); phosphohexose isomerase (PHI)
N-sam	Fibroblast growth factor receptor1 precursor (FGFR1); basic fibroblast growth factor receptor precursor (bFGFR); fms-like tyrosine kinase-2 (FLT2) + heparin-binding growth factor receptor (HBGF-R-alpha-A1) + HBGF-R-alpha-A2 + HBGF-R-alpha-A3
NTRK3	NT-3 growth factor receptor precursor; C-trk tyrosine kinase (TRKC)
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory alpha subunit (PTDINS-3-kinase P85-alpha; P85-alpha)
PKC11	Hint protein; protein kinase C inhibitor 1
PKCSH	Protein kinase C substrate 80-kDa protein heavy chain; 80K-H protein
PLGF	Placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2 )
PP-1A	Serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 catalytic subunit
PRKAR1B	cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit
RAP1GAP	Rap1 GTPase activating protein 1
rhoB	Transforming protein; ARHB; ARH6

## 8. Anhang zu den Ergebnissen

Fortsetzung 2 von Tab. 28. Abkürzungen der Gene, die beim Clontech-Array veränderte Expressionen aufweisen.

Gen-Symbol	Name des Gens
TAXREB302	DNA-binding protein; albumin D box-binding protein (DBP)
TDPX2	Thioredoxin peroxidase 2; thioredoxin-dependent peroxide reductase 2; proliferation-associated gene (PAG); natural killer cell enhancing factor A (NKEFA)
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1 precursor; erythroid potentiating activity (EPA); fibroblast collagenase inhibitor
TNF	Tumor necrosis factor precursor; cachectin
TTP	Tristetraproline; TIS11; ZFP36; growth factor-inducible nuclear protein 475 (NUP475)

## 8.2 Genexpressionsänderungen bei den Affymetrix-GeneChips

Tab. 29. Änderung der Genexpressionen bei den Affymetrix-GeneChips im Vergleich EC-Exposition gegen Kontrolle und im Vergleich (EC + TNF) gegen TNF, bei LOW-DOSE- und HIGH-DOSE-Expositionen; Pfeile zeigen Expressionsänderungen über 30 % an; alle Änderungen beziehen sich auf die Kammerkontrolle.

Gen-Symbol	Dosis		Genexpressions- änderung durch EC		Genexpressions- änderung durch (EC + TNF)		Genexpressions- änderung durch TNF
PLXNC1	LOW	↑	1482 % erhöht	↑	58 % erhöht	↑	433 % erhöht
	HIGH	↑	80 % erhöht		3 % verringert	↓	57 % verringert
TRPC6	LOW	↑	1063 % erhöht	↑	103 % erhöht	↑	379 % erhöht
	HIGH	↑	1273 % erhöht	↑	596 % erhöht	↑	150 % erhöht
MCJ	LOW	↑	782 % erhöht	↑	368 % erhöht	↑	40 % erhöht
	HIGH	↓	76 % verringert	↑	54 % erhöht	↑	34 % erhöht
PIG11	LOW	↑	434 % erhöht	↑	315 % erhöht	↑	259 % erhöht
	HIGH	↓	74 % verringert		22 % erhöht	↓	57 % verringert
TLE1	LOW	↑	205 % erhöht	↑	163 % erhöht	↑	105 % erhöht
	HIGH		26 % verringert		16 % verringert		9 % erhöht
ZNF144	LOW	↑	97 % erhöht		23 % erhöht	↑	86 % erhöht
	HIGH	↑	59 % erhöht		29 % erhöht		10 % erhöht



Fortsetzung von Tab. 29. Genexpressionsänderungen bei den Affymetrix-GeneChips.

Gen-Symbol	Dosis		Genexpressions- änderung durch EC		Genexpressions- änderung durch (EC + TNF)		Genexpressions- änderung durch TNF
MUC5B	LOW	↑	91 % erhöht	↑	65 % erhöht	↑	73 % erhöht
	HIGH		5 % erhöht		6 % erhöht		13 % erhöht
PLA2G2A	LOW		28 % verringert	↓	60 % verringert	↑	58 % erhöht
	HIGH	↑	75 % erhöht		25 % verringert	↓	31 % verringert
HSPA6	LOW		27 % erhöht		22 % verringert	↑	232 % erhöht
	HIGH		3 % erhöht		24 % erhöht		11 % erhöht
USP7	LOW	↑	74 % erhöht		16 % erhöht	↑	564 % erhöht
	HIGH	↑	71 % erhöht		23 % verringert	↑	62 % erhöht
ACHE	LOW	↓	77 % verringert		7 % verringert	↓	73 % verringert
	HIGH	↑	390 % erhöht	↑	308 % erhöht	↑	205 % erhöht
DC12	LOW		4 % verringert		25 % verringert		13 % erhöht
	HIGH	↑	330 % erhöht	↑	240 % erhöht	↑	149 % erhöht
BIRC5	LOW		9 % erhöht	↑	31 % erhöht		3 % verringert
	HIGH	↑	193 % erhöht	↑	77 % erhöht		24 % erhöht
KIAA0186	LOW	↓	30 % verringert		1 % verringert		12 % verringert
	HIGH	↑	94 % erhöht	↑	34 % erhöht	↑	71 % erhöht
RPS11	LOW		15 % verringert		6 % verringert		4 % erhöht
	HIGH	↓	45 % verringert		23 % verringert	↓	30 % verringert
KIAA0870	LOW	↑	45 % erhöht	↑	57 % erhöht	↑	79 % erhöht
	HIGH		1 % verringert	↑	95 % erhöht		19 % verringert
FLJ10665	LOW	↓	39 % verringert	↓	66 % verringert	↓	71 % verringert
	HIGH		27 % verringert		10 % verringert	↑	136 % erhöht
PTPRN	LOW	↓	47 % verringert	↓	60 % verringert	↓	50 % verringert
	HIGH	↓	60 % verringert	↓	51 % verringert	↑	36 % erhöht
ABHD2	LOW	↑	42 % erhöht	↑	73 % erhöht	↑	65 % erhöht
	HIGH		8 % erhöht	↑	38 % erhöht	↓	49 % verringert

## 8. Anhang zu den Ergebnissen

---

Tab. 30. Abkürzungen der Gene, bei denen bei den Affymetrix-GeneChips eine Veränderung der Expression im Vergleich EC-Exposition gegen Kontrolle oder im Vergleich (EC + TNF) gegen TNF, bei LOW-DOSE- oder HIGH-DOSE-Expositionen detektiert wurde.

---

LOW-DOSE	
Gen-Symbol	Name des Gens
ACTG1	Actin, gamma 1
AP2B1	Adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
APP	Amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)
C1orf28	Chromosome 1 open reading frame 28
CALR	Calreticulin
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
FLJ20138	Homo sapiens cDNA FLJ20138 fis, clone COL07172, mRNA sequence
FLJ33459	Homo sapiens cDNA FLJ33459 fis, clone BRAMY2000585, mRNA sequence
Hqp0376	Hqp0376 protein [Homo sapiens], mRNA sequence
HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')
LOC220594	TL132 protein
MCJ	DNAJ domain-containing
MUC5B	Mucin 5, subtype B, tracheobronchial
PHLDA1	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
PIG11	p53-induced protein
PIGB	Phosphatidylinositol glycan, class B
PLA2G2A	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
PLXNC1	Plexin C1
RNA-HRL	RNA helicase-related protein [Homo sapiens], mRNA sequence
TLE1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
TRPC6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
USP7	Ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)
ZNF144	Zinc finger protein 144 (Mel-18)

---

Fortsetzung von Tab. 30. Abkürzungen der Gene, die bei den Affymetrix-GeneChips nach HIGH-DOSE-Exposition veränderte Expressionen aufweisen.

HIGH-DOSE	
Gen-Symbol	Name des Gens
ABHD2	Similar to hypothetical protein PRO2831 [Homo sapiens], mRNA sequence
ACHE	Acetylcholinesterase (YT blood group)
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
CPLX2	Complexin 2
DC12	DC12 protein
FLJ10665	Hypothetical protein FLJ10665
FLJ20580	Hypothetical protein FLJ20580
H3F3A	H3 histone, family 3A
HIF1	Huntingtin interacting protein 1
HNRPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)
KIAA0186	KIAA0186 gene product
KIAA0870	KIAA0870 protein
MADH6	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6 (Drosophila)
PTPRN	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N
RPS11	Ribosomal protein S11